Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Fünfundvierzigster Band.

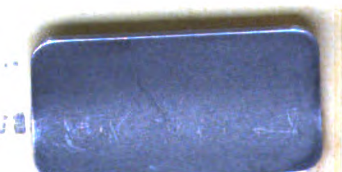
Ausgegeben am 30. September 1912.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.




CHE







Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. Els., **C. von Noorden**-Wien, **E. Salkowski**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **J. Bang**-Lund, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **G. Embden**-Frankfurt a. Main, **S. Flexner**-New York, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **U. Friedemann**-Berlin, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **H. J. Hamburger**-Groningen, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **R. Kobert**-Rostock, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **W. Loeb**-Berlin, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Berlin, **L. Michaelis**-Berlin, **J. Morgenroth**-Berlin, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **F. Roehmann**-Breslau, **P. Rona**-Berlin, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **F. Tangl**-Budapest, **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **J. Traube**-Charlottenburg, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Fünfundvierzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1912.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Über Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber.

I. Mitteilung.

Von

Gustav Embden und Friedrich Kraus.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

Die weitgehende Aufklärung der chemischen Struktur der Kohlenhydrate, die wir Emil Fischer verdanken, hat zahlreiche biologische Probleme der experimentellen Bearbeitung zugänglich gemacht.

Viele für die Kenntnis des Kohlenhydratstoffwechsels in Pflanze und Tier wichtige Tatsachen konnten so festgestellt werden, und immer mehr gewann man die Überzeugung, daß die Schicksale, welche die Kohlenhydrate bei ihrem biologischen Abbau und ihrem aufs engste mit diesem verknüpften Aufbau erleiden, durch die gesamte belebte Welt hindurch einander außerordentlich ähnlich sind.

Von einer lückenlosen Kenntnis des Kohlenhydratstoffwechsels in Tier und Pflanze sind wir allerdings noch sehr weit entfernt.

Von vornherein erscheinen die unter der Einwirkung von Bakterien und bei der Hefegärung sich an den Zuckerarten vollziehenden Abbauvorgänge der Erforschung am zugänglichsten. Denn hier kommt es nicht zu einer vollständigen Kohlenhydratverbrennung, deren einzige Produkte Wasser und Kohlensäure sind, sondern es treten charakteristische Substanzen, wie z. B. Milchsäure, Alkohol, Glycerin auf, deren strukturelle Beziehungen zu Kohlenhydraten zum Teil noch erkennbar sind.

Für den tierischen Organismus sind derartige feste Punkte, über die die Wege des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels hinführen müssen, nicht ohne weiteres erkennbar, und so kommt es, daß hier die Meinungen der Forscher auch über scheinbar einfache Fragen noch weit auseinandergehen.

So sehen Parnas und Baer[1]) in einer eben veröffentlichten Arbeit auf Grund von Versuchen, welche frühere Autoren an der Muskulatur anstellten, es als abgemachte Tatsache an, daß der Hauptweg des Kohlenhydratabbaues über Milchsäure führt, während v. Fürth[2]) in seinem jüngst erschienenen Werke gerade bei der Besprechung des Ursprungs der Milchsäure im Muskel wohl mit Recht hervorhebt, daß „die meisten Physiologen gegenwärtig zu der Meinung hinneigen, daß die Milchsäure nicht aus Kohlenhydraten, sondern aus Eiweiß entsteht".

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Versuche gehen auf das Jahr 1904 zurück, in dem der eine von uns gemeinschaftlich mit M. Almagia vergleichende Untersuchungen über den Milchsäuregehalt des Blutes vor und nach der Durchströmung der glykogenfreien und der glykogenhaltigen Hundeleber mit Rinderblut anstellte.

Embden und Almagia gelangten schon damals zu dem Ergebnis, daß die glykogenfreie und die glykogenhaltige Leber bezüglich ihrer Fähigkeit, Milchsäure zu bilden, sich verschieden verhalten.

Während nämlich der Milchsäuregehalt des Blutes nach der Durchströmung der glykogenfreien Leber nicht größer war als vorher, im Gegenteil des öfteren geringer, zeigte sich in den Versuchen an der glykogenhaltigen Leber stets eine wesentliche Vermehrung der Milchsäure nach der Durchblutung.

Auch in der glykogenfreien Leber wurde schon in den damaligen Versuchen Milchsäure gebildet, wenn dem Durchblutungsblut Traubenzucker oder Alanin hinzugefügt worden war.

Über diese Versuche hat Embden auf dem Internationalen

---

[1]) J. Parnas und J. Baer, Zuckerabbau und Zuckeraufbau im tierischen Organismus. Diese Zeitschr. **41**, 386, 1912.

[2]) O. v. Fürth, Probleme der physiologischen und pathologischen Chemie **1**, 147, Leipzig 1912.

Physiologenkongreß in Brüssel 1904 zuerst kurz berichtet[1]), und wir glauben, daß durch sie die Umwandlung von Kohlenhydraten in Milchsäure durch den tierischen Organismus exakt bewiesen wurde[2]).

Von einer Wiedergabe der damals gewonnenen analytischen Ergebnisse im einzelnen mußte abgesehen werden, da, wie sich bei weiterer Arbeit herausstellte, der von uns angewandten Methode verschiedene Fehler anhafteten. Namentlich war die Extraktion der Milchsäure mit Äther in unserem ersten Versuchen keine erschöpfende gewesen, und auch sonst konnten wir einige Bedenken methodischer Art nicht unterdrücken, wenn wir zu Zweifeln an der prinzipiellen Richtigkeit unserer ersten Versuchsergebnisse auch nie Veranlassung hatten.

---

[1]) Centralbl. f. Physiol. **18**, 832, 1905. — Auch in einer von v. Noorden und Embden (Centralbl. f. d. gesamte Physiol. u. Pathol. d. Stoffwechsels, Neue Folge, 1906, Heft 1, S. 1) veröffentlichten Mitteilung wurden die damaligen Ergebnisse erwähnt.

[2]) In ihrer bereits erwähnten Arbeit (l. c. S. 387) geben Parnas und Baer an, daß die Entstehung von Milchsäure aus Zucker am arbeitenden isolierten Katzenherzen durch Johannes Müller (Festschrift f. Rosenthal S. 343, 1906), am Skelettmuskel durch Fletcher und Hopkins (Journ. of Physiol. **35**, S. 247 bis 309) exakt bewiesen sei und bemerken, daß nach diesen Versuchen die Milchsäure als Hauptprodukt des intermediären Zuckerabbaues im lebenden tierischen Organismus angesehen wird. Die Wiedergabe, welche die Untersuchungen von Fletcher und Hopkins durch Parnas und Baer finden, ist durchaus irrtümlich. Fletcher und Hopkins haben gelegentlich ihrer schönen Untersuchungen über die Milchsäurebildung in der Muskulatur der Froschschenkel die Frage des Ursprungs der Milchsäure wohl berührt, sind aber weit davon entfernt, durch ihre Versuche die Entstehung der Milchsäure aus Kohlenhydrat beweisen zu wollen. Bei der Fortführung seiner gemeinschaftlich mit Hopkins ausgeführten Untersuchungen konnte dann Fletcher dartun, daß der Zusatz von Traubenzucker ohne jeden Einfluß auf den Umfang der Milchsäurebildung in der zerkleinerten Muskulatur von Kaninchen — und auch von Fröschen — ist, wenn nicht bakterielle Infektion eintritt. Auf Grund dieser Versuche kommt Fletcher zu dem Schluß, daß kein glykolytisches Ferment, das zur Milchsäurebildung führt, im Muskel zu existieren scheint. (W. M. Fletcher, Journ. of Physiol. **43**, 286 bis 312, 1911). Sowohl auf die Arbeiten der englischen Forscher wie auch auf die eben erwähnten Untersuchungen von Johannes Müller wird in einigen der nachstehenden Arbeiten Bezug genommen werden müssen (Embden, Kalberlah. Engel, diese Zeitschr., **45**, 45, 1912. — Kura Kondo, ebenda S. 63).

Über die mit verbesserter Methodik von uns ausgeführten Untersuchungen wurde dann von Embden auf dem Kongreß für innere Medizin in Wiesbaden 1909 berichtet.

Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, die damals angewandte Methodik zu schildern und die nötigen analytischen Belege mitzuteilen.

Gleich hier wollen wir bemerken, daß seit der Ausführung der vorliegenden Arbeit das wertvolle titrimetrische Verfahren von v. Fürth und Charnaß[1]) veröffentlicht wurde, das in verbesserter Form neben der bereits von uns angewandten Art der gravimetrischen Bestimmung in der auf diese folgenden Arbeit von S. Oppenheimer[2]) zur Anwendung gelangte.

Bereits in der vorliegenden Untersuchung konnten wir in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen von Neuberg und Langstein[3]) feststellen, daß Milchsäure im tierischen Organismus nicht nur aus Kohlenhydraten, sondern auch aus dem Eiweißspaltungsprodukt Alanin gebildet wird.

Mehr noch löste sich die Frage der Milchsäurebildung von der des Kohlenhydratabbaues bei Untersuchungen über Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft los, die in nachfolgenden Arbeiten von Embden, Kalberlah und Engel sowie von Kura Kondo niedergelegt sind.

Ergab sich also einerseits die Notwendigkeit, das Problem der Milchsäurebildung im Tierkörper auch unabhängig von den Fragen des Kohlenhydratabbaues zu bearbeiten, so konnten wir andererseits bei der Untersuchung des intermediären Kohlenhydratstoffwechsels nicht bei der Feststellung der Milchsäure als Abbauprodukt stehen bleiben.

Wir mußten vielmehr auch den Wegen nachgehen, die von den Kohlenhydraten zur Milchsäure und weiterhin von der

---

[1]) v. Fürth und D. Charnaß, Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittelung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. Diese Zeitschr. **26**, 199, 1910.

[2]) Siegfried Oppenheimer, Über Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber. 2. Mitteilung. Diese Zeitschr. **45**, 30, 1912. — Eine Schilderung des v. Fürth-Charnaßschen Verfahrens in der hier angewandten Form findet sich im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden **5**, S. 1256.

[3]) C. Neuberg und L. Langstein, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., **1903**, 514.

Milchsäure zu den Endprodukten der Kohlenhydratverbrennung führen.

Überall zeigten sich hier Abbau und Aufbau der Kohlenhydrate aufs engste miteinander verknüpft.

Wir gehen nunmehr zur Besprechung unserer Leberdurchblutungsversuche über.

Methodik[1]).

1. Vorbereitung der Versuchstiere.

Für die Versuche werden Hunde im Gewicht von 7 bis 10 kg angewendet. Ihre Vorbereitung zum Versuch ist verschieden, je nachdem der Versuch an der glykogenreichen oder an der glykogenfreien Leber angestellt werden soll.

Zur Erzielung einer glykogenreichen Leber werden die Tiere zunächst mit einer reichlichen gemischten Kost ernährt. 2 bis $2^1/_2$ Tage vor dem Versuch wird mit der Verabreichung großer Rohrzuckermengen in konzentrierter wässeriger Lösung mittels Schlundsonde begonnen. Pro Tag erhalten die Tiere etwa 300 bis 400 g Rohrzucker. Während der letzten 24 Stunden wird außer Rohrzucker keine Nahrung verabreicht. Die letzte Rohrzuckergabe erfolgt etwa 3—5 Stunden vor dem Versuch. Der Glykogengehalt der Leber ist alsdann ein sehr hoher (bis 20 % des feuchten Lebergewichts). Es gibt Hunde, die auf die Rohrzuckereingießung mit starken Durchfällen reagieren. Diese sind zum Versuch ungeeignet.

Die Durchströmung der abnorm glykogenhaltigen Leber bietet keine besonderen Schwierigkeiten. Nur muß man bei der Vorbereitung der Durchblutung die Leber besonders schonend behandeln, da der hohe Glykogengehalt das Organ sehr zerreißlich macht.

Die Vorbereitungen eines Versuchs an der glykogenfreien Leber sind nicht ganz so einfach. Um glykogenfreie Hundelebern zu erhalten, wurde die Methodik befolgt, die Embden schon früher beim Studium der Zuckerbildung in der überlebenden Leber verwendet hat[2]). Der Hund erhält

---

[1]) Die nachfolgenden methodischen Angaben sind von Embden bereits im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 5, 1253ff. veröffentlicht worden.

[2]) G. Embden, Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 44, 1904.

3 Tage vor dem Versuch keine Nahrung (dagegen Wasser). Unmittelbar vor dem Versuch wird das Tier mit Strychnin vergiftet. Es erhält zunächst etwa 1 mg Strychnin. nitricum subcutan. Die Krämpfe sollen nur ganz allmählich einsetzen. Sobald sie stärker werden, wird an dem vorher in Äthernarkose tracheotomierten Tier künstliche Atmung eingeleitet.

Sind 40 Minuten nach der ersten Strychnininjektion deutliche Krämpfe (oder wenigstens eine sehr starke Steigerung der Reflexerregbarkeit) noch nicht eingetreten, so wird nochmals 1 mg oder 0,5 mg gegeben. Größere Dosen führen leicht zum Tode während des ersten stärkeren Krampfanfalles.

Hat das Tier 1 bis 1 $^1/_2$ Stunden Krämpfe gehabt, so wird es, falls nicht während dieser Zeit der Tod spontan eingetreten ist, durch Entbluten aus den Femoralgefäßen getötet.

Vor der Durchblutung wird ein kleines Läppchen der Leber mit einem nassen, starken Bindfaden abgebunden und mit der Schere abgetrennt. Mit dem Läppchen (dessen Gewicht mindestens 10 bis 15 g betragen soll) wird sofort eine Glykogenbestimmung nach Pflüger angesetzt. War die Vorbereitung des Tieres richtig, so läßt sich Glykogen in dem Läppchen nicht oder nur in Spuren nachweisen.

In neuerer Zeit hat sich herausgestellt, daß die Milchsäurebildung bei der Durchblutung der Leber nicht nur dann ausbleibt, wenn das Organ glykogenfrei, sondern auch, wenn es recht glykogenarm ist. Es scheint, daß im allgemeinen einfacher viertägiger Hunger ohne Strychninisierung einen ausreichenden Grad von Glykogenarmut hervorruft.

Bekanntlich kann man durch Phlorizinverabreichung an Hungerhunde die Leber ziemlich leicht von Glykogen befreien. Es ist aber nicht zweckmäßig, sich dieses Verfahrens zu bedienen, weil die bei der Durchströmung der phlorizindiabetischen Leber auftretenden erheblichen Mengen von β-Oxybuttersäure eine exakte Milchsäurebestimmung unmöglich machen.

2. Bestimmung der Milchsäure in Blut und Leber.

Blut und Leber werden in gleicher Weise verarbeitet. Die Enteiweißung des Blutes resp. der möglichst fein zerkleinerten Leber erfolgt nach Schenck[1]) mit Salzsäure und Sublimat. Die

[1]) Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 2, 184.

gewonnenen Flüssigkeiten bleiben über Nacht im Eisschrank. Am nächsten Morgen wird abgenutscht (ohne Nachwaschen).

Die Filtrate werden mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber, dann sofort durch einen kräftigen Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreit. Aliquote, gemessene Teile werden weiter verarbeitet. Die Milchsäurebestimmungen im Blute werden stets doppelt vorgenommen, und zwar gewöhnlich an je 1200 ccm Blutfiltrat, entsprechend 200 ccm Blut. Bei der Leber reicht das Material für Doppelbestimmungen im allgemeinen nicht aus. Die für die Einzelbestimmung abgemessene Filtratmenge wird mit starker Natronlauge genau neutralisiert und dann mit verdünnter Salzsäure ganz schwach angesäuert. Das ist nötig, weil sonst bei dem nun folgenden Einengen die Reaktion leicht alkalisch wird, wobei der stets im Filtrat vorhandene Zucker unter Bildung ätherlöslicher Säuren (speziell auch Milchsäure) zersetzt werden könnte.

Die Einengung des Filtrats erfolgt im Vakuum bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers bis auf etwa 100 ccm. Die eingeengte Flüssigkeit muß völlig klar und nahezu farblos sein. (Trübung ist meist dadurch bedingt, daß die Lösung alkalisch geworden ist und infolgedessen die Phosphate ausgefallen sind.) Nachdem man sich nach der Einengung davon überzeugt hat, daß die Flüssigkeit neutral oder ganz schwach sauer reagiert (ist alkalische Reaktion eingetreten, so wird die Bestimmung verworfen), wird sie in einen Extraktionsapparat nach Lind[1]) übergespült, mit 15 ccm einer konzentrierten Phosphorsäurelösung (Gehalt an P_2O_5 ca. 60%) angesäuert, mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt und mit Äther extrahiert.

Die Extraktion wird nach 30 (besser erst nach 40) Stunden unterbrochen und die ätherische Lösung im Kolben weiterverarbeitet.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Extraktion wird ein neues Extraktionskölbchen mit dem Apparat verbunden und nochmals 10 bis 20 Stunden (in neuerer Zeit mindestens 20 Stunden) extrahiert. In diesem zweiten Ätherextrakt läßt sich oft gar keine Milchsäure mehr nachweisen, manchmal sind noch minimale Spuren vorhanden.

[1]) Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 3, II, 931.

Das erst gewonnene Extrakt bleibt kurze Zeit stehen und wird dann unter Nachwaschen mit Äther in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Etwa am Boden und den Wänden des Extraktionskölbchens haftenden Tröpfchen wässeriger Flüssigkeit werden die ätherlöslichen Substanzen und das Wasser durch öfters wiederholtes Schütteln mit nicht zu kleinen Äthermengen entzogen. Der filtrierte Ätherextrakt wird unter Zusatz von 20 ccm Wasser auf dem Wasserbade zur Verjagung des Äthers destilliert. Die gewonnene Flüssigkeit wird nach Zusatz von 200 bis 300 ccm Wasser mit reinem Bleicarbonat[1]) im Überschuß versetzt und etwa 1 Stunde auf dem lebhaft siedenden Wasserbade erwärmt. Die Flüssigkeit bleibt über Nacht im Eisschrank stehen und wird dann unter Dekantieren vom Bleiniederschlag und gründlichem Waschen mit kaltem Wasser filtriert. Durch die Bleibehandlung wird die stets bei der Ätherextraktion in nicht unerheblicher Menge mitgerissene Phosphorsäure quantitav entfernt.

Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff entbleit, vom Sulfidniederschlag unter Nachwaschen mit heißem Wasser abfiltriert, durch einen Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und nun während einer Stunde mit reinem Zinkcarbonat[2]) erwärmt. Vom überschüssigen Zinkcarbonat wird unter Nachwaschen mit heißem Wasser abfiltriert, das Filtrat zunächst in einer Porzellanschale auf etwa 20 ccm eingeengt, dann von einem sich stets ausscheidenden Niederschlag — wiederum unter Nachwaschen mit heißem Wasser — nochmals abfiltriert und nunmehr in gewogenen, durch Schliffdeckel verschließbaren Wägeschälchen auf ein kleines Volumen eingeengt. Die Krystallisation des Zinklactats erfolgt im nicht evakuierten Exsiccator.

Bei manchen Versuchen (z. B. bei der Gewinnung von

---

[1]) Auch die reinsten, im Handel vorkommenden Präparate von Bleicarbonat enthalten fast immer merkliche Mengen von wasserlöslichen, alkalisch reagierenden Verunreinigungen. Es ist unbedingt notwendig, die letzteren durch sehr oft wiederholte Behandlung des Präparates mit heißem Wasser zu entfernen, bis destilliertes Wasser mit einer Probe des Präparats geschüttelt, nach dem Filtrieren gegen empfindliches Lackmuspapier nicht mehr alkalisch reagiert.

[2]) Von den käuflichen Zinkcarbonatpräparaten gilt ganz das in der vorangehenden Fußnote für das Bleicarbonat Gesagte.

Zinklactat aus Blut nach Durchströmung der glykogenreichen Leber) ist die Krystallisation des Zinklactats sehr vollständig und eine Bestimmung des Krystallwassers und des Zinkgehaltes liefert völlig oder nahezu richtige Ergebnisse (siehe weiter unten).

In anderen Fällen ist aber das Zinklactat sehr stark verunreinigt und die Krystallisation eine sehr unvollkommene. In allen, nachstehend mitgeteilten Versuchen dauerte die Durchblutung, wo nicht ausdrücklich Anderes angegeben ist, 2 Stunden.

Versuchsergebnisse.

Bei der Besprechung unserer Versuchsergebnisse wollen wir zunächst auf die bei der Durchströmung der glykogenfreien oder äußerst glykogenarmen Leber gewonnenen Resultate eingehen.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr. des Versuchs	Glykogengehalt der Leber	Gewicht der Leber vor dem Versuch	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A erhaltenes Lactat	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B erhaltenes Lactat	Aus d. durch Wägung bestimmten Lactat berechnete Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Zu- oder Abnahme des Milchsäuregehaltes		Milchsäuregehalt d. Leber (auf 1200 ccm Filtrat berechnet)	Bemerkungen
						Blut A	Blut B	pro 1000 ccm Blut	in Proz. des Ausgangswertes		
		g	g	g	g	g	g	g		g	
1	Glykogenfrei (?)	ca. 360	—	0,110 0,105	0,068 0,073	0,407 0,388	0,252 0,270	— 0,137	— 34	0,110	4 Tage Hunger und Strychnisierung.
2	Spuren	175	—	0,079	0,048 0,052	0,292	0,178 0,192	— 0,107	— 37		6 Tage Hunger und Strychnisierung, Blutmenge, 1800 ccm Harn reduzierte Fehling, nicht Nylander.
3	—	319	—	0,101 0,104	0,092 0,086	0,374 0,384	0,340 0,320	— 0,049	— 10	—	Die einzelnen Lactate dieser zwei Versuche wurden von S. Oppenheimer dem Aldehydverfahren unterworfen. Die Resultate finden sich in der folgenden Arbeit, Tabelle I.
4	—	130	—	— 0,133	— 0,096	— 0,491	— 0,357	— 0,134	— 27	0,130	

In Tabelle I sind 4 derartige Versuche zusammengestellt. Aus Kolonne 3 geht das Gewicht der zur Durchblutung be-

nutzten Leber vor der Durchströmung hervor. Kolonnen 5 und 6 geben Aufschluß über die aus je 1200 ccm Blutfiltrat (entsprechend 200 ccm Blut) gewonnene Menge wasserfreien Zinklactats; die untereinander stehenden Zahlen geben die Resultate von Doppelbestimmungen wieder. In den Kolonnn 7 und 8 sind diese Werte auf Milchsäure und 1000 ccm Blut umgerechnet. Aus Kolonne 9 ist die Zu- oder Abnahme an Milchsäure in g pro 1000 ccm ersichtlich. Kolonne 10 gibt die Zu- oder Abnahme der Milchsäure im Blute nach der Durchblutung (Blut B) in Prozenten der im Blute vor der Durchblutung (Blut A) vorhandenen Milchsäuremenge an. Der Milchsäuregehalt der Leber nach der Durchblutung wurde in den Versuchen 1 und 4 bestimmt und wieder auf 1200 ccm Filtrat (entsprechend 200 g Leber) umgerechnet.

Wie aus einem Vergleich der Kolonnen 5 und 6 hervorgeht, ist in keinem der Fälle eine Vermehrung der Milchsäure während der Durchblutung eingetreten, im Gegenteil, der Milchsäuregehalt des Blutes B erscheint in allen Fällen geringer als der des Blutes A, wenn auch in einem Teil der Versuche (namentlich in Versuch 3) die beobachtete Abnahme kaum außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung liegt. Wir wollen noch erwähnen, daß, während das Lactat aus Blut A in fast allen Fällen recht vollständig krystallisiert war, das Zinksalz aus Blut B wenig oder keine Neigung zur Krystallisation zeigte, also anscheinend stärker verunreinigt war als die aus Blut A gewonnene Substanz. Der Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme wird in der auf diese folgenden Arbeit von S. Oppenheimer erbracht werden, in der die Versuche 3 und 4 nochmals Erwähnung finden und wo weitere Durchblutungsversuche an der glykogenfreien Leber niedergelegt sind.

Wurde also bei der Durchströmung der glykogenfreien oder äußerst glykogenarmen Leber eine Milchsäurevermehrung im Blute nicht erzielt, so waren die Ergebnisse bei der Durchströmung der abnorm glykogenreichen Leber ganz andere. Die Versuche wurden an etwa ebenso großen Hunden, wie sie für die Durchblutung an der glykogenfreien Leber dienten, vorgenommen. Das Lebergewicht war aber zum Teil ein erheblich größeres als in den eben genannten Versuchen wegen des großen Glykogenreichtums.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr. des Versuchs	Glykogengehalt der Leber	Gewicht der Leber vor der Durchblutung	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A erhaltenes Lactat	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B erhaltenes Lactat	Aus d. durch Wägung bestimmten Lactat berechnete Milchsäuremenge pro 1000 ccm Blut		Zu- oder Abnahme des Milchsäuregehaltes		Milchsäuregehalt d. Leber (auf 1200 ccm Filtrat berechnet)	Bemerkungen
						Blut A	Blut B	pro 1000 ccm Blut	in Proz. d. Ausgangswertes		
		g		g	g	g	g	g		g	
5	Glykogenreich	385	—	0,036 0,032	0,164 0,151	0,133 0,115	0,607 0,559	+ 0,459	+ 370	—	Hund wurde die letzten 72 Std. mit 700—800 g Rohzucker gefüttert.
6	„	390	—	0,115 0,115	0,412 0,420	0,425 0,425	1,524 1,554	+ 1,114	+ 262	—	Mit Zucker gefüttert.
7	„	580	—	0,140	0,460 0,445	0,518	1,702 1,646	+ 1,156	+ 223	—	Mit Zucker gefüttert. Durchblutungsversuch nur 90 Min. durchgeführt (1900 ccm Blut).
8	„	655	—	0,100 0,101	0,293 0,274	0,370 0,370	1,084 1,014	+ 0,679	+ 183	—	Hund 3 Tage mit Zucker gefüttert. Dauer d. Durchblutung: 1 Std.

In sämtlichen 4 Versuchen der Tabelle II ist eine außerordentlich starke Vermehrung der Milchsäure eingetreten, die ohne weiteres aus den Kolonnen 5 und 6 ersichtlich ist. Die Menge der neugebildeten Milchsäure schwankt pro Liter Blut zwischen fast 0,5 g im Versuch 5 und wesentlich mehr als 1 g in den Versuchen 6 und 7. Da die Durchströmung in Versuch 7 mit 1900 ccm Blut vorgenommen wurde, ist also in diesem Versuche die Gesamtmenge neugebildeter Milchsäure wesentlich größer als 2 g.

In Prozenten des Milchsäuregehalts von Blut A schwankt die Zunahme in Blut B zwischen 183⁰/₀ in Versuch 8 und 370⁰/₀ in Versuch 5.

Ganz im Gegensatz zu den Versuchen an der glykogenfreien Leber war hier das Zinklactat aus Blut B stets rein krystallinisch. In einem älteren Versuche, der wegen möglicher Unvollständigkeit der Milchsäureextraktion nicht in die Tabelle aufgenommen wurde, in dem aber die Menge der neugebildeten

Milchsäure von ähnlicher Größe war wie in Versuch 7, wurde eine Krystallwasser- und Zinkbestimmung mit dem gewonnenen Lactat vorgenommen. 0,2420 g der exsiccatortrockenen Substanz verloren, bei 110° bis zur Gewichtskontanz getrocknet, 0,0312 g Wasser. Daraus berechneter Krystallwassergehalt: 12,89%, für paramilchsaures Zink berechneter Krystallwassergehalt: 12,89%. 0,2108 g der wasserfreien Substanz wurden im Platintiegel vorsichtig verascht und auf dem Bunsenbrenner bis zur Gewichtskonstanz geglüht.

Gefundene Menge Zinkoxyd . . .	0,0697 g
Berechnet für $(CH_3CHOHCOO)_2Zn$.	33,44% ZnO
Gefunden	33,06% ZnO

Wie man sieht, war in diesem Versuche, in dem eine sehr starke Milchsäurevermehrung eingetreten war, das isolierte milchsaure Zink reines paramilchsaures Zink, oder die Verunreinigungen waren doch so gering, daß sie in der Analyse nicht zum Ausdruck kamen[1]).

Daß es sich um paramilchsaures Zink handelte, wurde bei der eben besprochenen Analyse aus dem Krystallwassergehalt von genau 2 Molekülen geschlossen (das gärungsmilchsaure Zink krystallisiert bekanntlich mit 3 Molekülen Wasser). Wir haben uns aber noch besonders durch polarimetrische Untersuchung von der optischen Aktivität des von uns isolierten Zinklactats überzeugt. In einem an der glykogenreichen Leber besonders angestellten Versuche wurden aus 2500 ccm Blutfiltrat B, entsprechend etwa 417 ccm Blut, 1,5469 g wasserfreies, schön krystallisiertes Zinklactat gewonnen. Die nicht umkrystallisierte Substanz wurde direkt zur polarimetrischen Untersuchung verwendet. Das Gewicht der wässerigen Lösung betrug 20,5023 g, das spezifische Gewicht der Lösung bei 21° 1,039. Der abgelesene Drehungswinkel war bei Anwendung eines 2 dcm-Rohrs und bei einer Temperatur von 21° = — 0,960°. Möglicher Ablesungsfehler: ± 0,01°. Daraus berechneter Wert für $[\alpha]_D$ = — 6,123°. Die beobachtete spezifische Drehung ist in diesem Falle ein wenig geringer als

[1]) Wir sahen bereits oben, daß bei der Durchblutung der glykogenfreien Leber das schließlich isolierte Zinksalz hochgradig verunreinigt ist.

man nach den Untersuchungen von Hoppe-Seyler und Araki[1]) für ähnlich konzentrierte Lösungen von rechtsmilchsaurem Zink erwarten darf, doch dürfte das milchsaure Zink in geringem Grade verunreinigt gewesen sein.

In einem neuerlich vorgenommenen Versuche wurde aus der konzentrierten wässerigen Lösung des Zinksalzes die Hauptmenge des letzteren durch Zusatz von etwas Alkohol und Stehen im Eisschrank ausgeschieden. Das schön krystallisierte Präparat zeigte ohne Umkrystallisieren einen Krystallwassergehalt von 13,1 %.

0,3639 g wasserfreies Zinklactat wurden in Wasser gelöst und genau auf 18 ccm aufgefüllt.

Im 2 dcm-Rohr und bei einer Temperatur von 22° betrug die Drehung der Lösung — 0,40° (± 0,01°). Daraus berechneter Wert für $[\alpha]_D = -9,9$.

Aus einem Vergleich der Versuche an der glykogenfreien Leber und an der glykogenreichen Leber ergibt sich also ein vollkommen gegensätzliches Verhalten bezüglich der Milchsäurebildung:

Nach der Durchströmung der glykogenfreien Leber: Gleichbleiben oder Abnahme der Milchsäure, bei der Durchblutung der glykogenreichen Leber: Zunahme um mehrere Hundert Prozent.

Hierdurch wird es schon in hohem Maße wahrscheinlich, daß die Quelle der in der glykogenreichen Leber gebildeten Milchsäure eben in dem Glykogen bzw. in dem aus dem Glykogen gebildeten Traubenzucker zu suchen ist.

Strenge bewiesen wird diese Annahme durch einige weitere Versuche an der glykogenfreien Leber, in denen dem Durchblutungsblute größere Mengen reinen Traubenzuckers in wässeriger Lösung zugefügt wurden. Die Versuche unterscheiden sich also von den in Tabelle I zusammengefaßten eben nur durch diesen Traubenzuckerzusatz, abgesehen von der in den Versuchen 12 und 13 (Tabelle III) etwas größeren Durchblutungszeit.

---

[1]) Hoppe-Seyler und Araki, Über die Einwirkung der bei Sauerstoffmangel im Harn ausgeschiedenen Milchsäure auf polarisiertes Licht und die Rotationswerte aktiver Milchsäuren im allgemeinen. Zeitschr. f. physiol. Chemie **20**, 365, 1895.

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr. des Versuchs	Glykogengehalt der Leber %	Gewicht der Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A erhaltenes Lactat g	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B erhaltenes Lactat g	Aus d. durch Wägung bestimmten Lactat berechnete Milchsäuremenge pro 1000 ccm Blut Blut A g	Blut B g	Zu- oder Abnahme des Milchsäuregehaltes pro 1000 ccm Blut g	in Proz. d. Ausgangswertes	Milchsäuregehalt d. Leber (auf 1200 ccm Filtrat berechnet) g	Bemerkungen
9	0,067	295	6 g Traubenzucker	0,091 0,093	0,190 0,177	0,337 0,340	0,703 0,655	+ 0,341	+ 101	0,155	3 Tage Hunger u. Strychninisierung. Durchblutungsversuch $1^3/_4$ Std.
10	0,08	300	10 g Traubenzucker	0,099 0,093	0,238 0,242	0,366 0,344	0,881 0,895	+ 0,533	+ 150	0,188	3 Tage Hunger u. Strychninisierung. Durchblutungsversuch 2 Std.
11	0	152	10 g Traubenzucker	0,104 0,103	0,178 0,198	0,385 0,381	0,659 0,733	+ 0,313	+ 81	0,196	4 Tage Hunger u. Strychninisierung. Durchblutungsversuch 2 Std.
12	0	256	13 g Traubenzucker	0,083 0,066	0,180 0,193	0,307 0,244	0,666 0,714	+ 0,414	+ 150	0,163	do. Beginn des Versuchs m. 2200 ccm Blut, allmählich verringert, Dauer im ganz. 3 Std.
13	0,004	300	13 g Traubenzucker	0,109 0,109	0,169 0,160	0,403 0,403	0,625 0,592	+ 0,206	+ 51	0,149	do. do.

Ohne weiteres ist aus den Kolonnen 5 und 6 ersichtlich, daß bei der Durchströmung unter Traubenzuckerzusatz in allen Fällen eine erhebliche Zunahme der Milchsäure stattgefunden hat. Die gebildete Milchsäuremenge pro Liter Durchblutungsblut schwankt zwischen etwa 0,2 g in Versuch 13 und etwas mehr als 0,5 g in Versuch 10. Die größte aus Traubenzucker gebildete Menge kommt also etwa der geringsten bei Durch-

Bemerkung: In einigen älteren Versuchen mit besonders geringer Durchströmungszeit (1 Stunde) konnte eine Milchsäurebildung aus Traubenzucker nicht nachgewiesen werden. Offenbar hält während dieser Zeit die weitere Verarbeitung der Milchsäure durch die Leber der Milchsäurebildung aus Traubenzucker die Wage. Auf die Einzelergebnisse dieser Versuche möchten wir hier nicht eingehen, weil die Methode zur Zeit der Ausführung der Versuche möglicherweise noch einige Fehler enthielt, die wir später vermieden haben.

strömung der abnorm glykogenreichen Leber (Tabelle II, Versuch 5) gebildeten Milchsäuremenge gleich. Anscheinend also bildet die Leber aus intracellulär abgelagertem Glykogen leichter Milchsäure als aus Traubenzucker, der ihr mit dem sie durchströmenden Blute zugeführt wird, ohne in Glykogen umgewandelt zu werden. Denn das sei hier ausdrücklich erwähnt, die künstlich durchströmte glykogenfreie Leber bildet bei Zusatz recht großer Traubenzuckermengen zu dem Durchblutungsblute unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen niemals mehr Glykogen[1]). Die unter Traubenzuckerzusatz künstlich durchströmte Leber befindet sich also bezüglich der ihr zur Verfügung stehenden Kohlenhydrate in gewisser Beziehung in ähnlicher Lage, wie die Leber bei schwerem Diabetes. Auch hier werden die Leberzellen von einem abnorm zuckerreichen Blute umspült, und auch hier vermögen sie aus irgendeinem Grunde den ihnen zugeführten Zucker nicht mehr in Form von Glykogen abzulagern. Daß auch in der Leber des zuckerkranken Organismus die mangelnde oder mangelhafte Fähigkeit, Glykogen abzulagern, von ungünstigem Einfluß auf den Umfang des innerhalb der Leber sich abspielenden Kohlenhydratabbaus ist, möchten wir gerade auch auf Grund der eben mitgeteilten Versuche für recht wahrscheinlich halten.

Aus den bisherigen Versuchen geht also hervor, daß die Milchsäure bei der künstlichen Durchströmung der Leber als Abbauprodukt der Kohlenhydrate gebildet wird, und es kann wohl kaum einem Zweifel unterliegen, daß die im normalen intermediären Stoffwechsel auftretende und unter gewissen pathologischen Verhältnissen auch mit dem Harn ausgeschiedene Milchsäure wenigstens zum Teil den Kohlenhydraten entstammt.

Sind nun aber die Kohlenhydrate die einzige Quelle der Milchsäure im tierischen Organismus? Das ist sicher nicht der Fall, wie aus einigen weiteren Versuchen, die wir unter Zusatz von d-l-Alanin anstellten, hervorgeht. Die Versuche sind in Tabelle IV, Versuche 14 und 15, wiedergegeben.

---

[1]) In Versuchen von Karl Grube (Weitere Untersuchungen über Glykogenbildung in der überlebenden, künstlich durchströmten Leber, Arch. f. d. ges. Physiol. **107**, 490, 1905; Untersuchungen über die Bildung des Glykogens in der Leber, ebenda **118**, 1, 1907) an der Hunde- und namentlich an der Schildkrötenleber wurde eine Glykogenbildung aus der Durchströmungsflüssigkeit zugesetztem Traubenzucker erzielt.

Tabelle IV.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr. des Versuchs	Glykogengehalt der Leber	Gewicht der Leber vor der Durchblutung	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A erhaltenes Lactat	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B erhaltenes Filtrat	Aus d. durch Wägung bestimmten Lactat berechnete Milchsäuremenge pro 1000 ccm Blut		Zu- oder Abnahme des Milchsäuregehaltes		Milchsäuregehalt d. Leber (auf 1200 ccm Filtrat berechnet)	Bemerkungen
						Blut A	Blut B	pro 1000 ccm Blut	in Proz. d. Ausgangswertes		
	%	g		g	g	g	g	g		g	
14	0	350	7 g d-l-Alanin	0,091 0,093	0,192 0,187	0,337 0,344	0,710 0,692	+ 0,360	+ 107	0,152	3 Tage Hunger u. Strychninisierung. Durchblutungsversuch 2 Std. mit 1700 ccm Blut.
15	—	—	5 g d-l-Alanin	0,1108	0,207	0,411	0,767	+ 0,356	+ 87	—	Strychninleber. Dauer des Versuchs 55 Min.

In Versuch 14 ist, wie aus den Kolonnen 5 und 6 hervorgeht, die Milchsäuremenge auf etwa das Doppelte gestiegen. Die absolute und prozentische Vermehrung ist von sehr ähnlicher Größe wie in Versuch 9 (Tabelle III), der unter Traubenzuckerzusatz angestellt wurde. Versuch 15 ist ein älterer Versuch, bei dem die Milchsäurebildung in A und B an je 1000 ccm Filtrat vorgenommen wurde. Die Ätherextraktion war möglicherweise nicht ganz erschöpfend. In den Kolonnen 5 und 6 sind die an 1000 ccm Filtrat vorgenommenen Bestimmungen auf 1200 ccm umgerechnet. Die Dauer der Durchblutung betrug in diesem Falle nur 55 Minuten. Das Ergebnis dieses Versuchs ist dem des vorangehenden sehr ähnlich.

Aus den eben besprochenen Versuchen unter Zusatz von Alanin geht also hervor, daß auch das Alanin ein starker Milchsäurebildner bei der Durchblutung ist.

Die wesentlichsten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung können wir folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die völlig oder nahezu glykogenfreie Leber bildet bei zweistündiger Durchströmung mit Rinderblut ohne Zusatz keine Milchsäure, im Gegenteil, des öfteren findet eine deutliche Verminderung der von vornherein im Blute vorhandenen Milchsäure statt.

2. Im Gegensatz hierzu tritt bei Durchströmung der glykogenreichen Leber unter den gleichen Versuchsbedingungen stets eine sehr starke Vermehrung der Milchsäure auf. Die gebildete Milchsäure ist d-Milchsäure.

3. Milchsäurebildung kann, wenn auch in etwas geringerem Maße, auch erzielt werden, wenn dem Durchblutungsblut bei der Durchströmung einer glykogenfreien Leber Traubenzucker in großen Mengen hinzugefügt wird.

4. Auch dem Durchblutungsblut zugesetztes d-l-Alanin erweist sich als Milchsäurebildner.

5. Danach kann in der künstlich durchbluteten Leber sowohl aus Kohlenhydrat, wie auch aus der Aminosäure Alanin (letzteres in Übereinstimmung mit früheren Fütterungsversuchen von Neuberg und Langstein) Milchsäure gebildet werden[1]. Es sind also offenbar sowohl die Kohlenhydrate als auch die Eiweißkörper an der Milchsäurebildung beteiligt, die Kohlenhydrate allerdings höchstwahrscheinlich in weit höherem Maße.

6. Bei der Milchsäurebildung aus d-l-Alanin tritt nach den von O. Neubauer und seinen Mitarbeitern ausgeführten Untersuchungen aller Wahrscheinlichkeit nach Brenztraubensäure als intermediäres Produkt auf. Daß dies beim Abbau der Kohlenhydrate zu Milchsäure nicht der Fall ist, geht, wie wir glauben, aus einer der nachfolgenden Arbeiten hervor.

[1]) Für eine Milchsäurebildung aus anderen Aminosäuren konnten wir in einigen weiter angestellten Versuchen Anhaltspunkte bisher nicht gewinnen.

Über das Verhalten des Glycerins bei der künstlichen Durchblutung der Leber.

Von

Ernst Schmitz.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In der vorangehenden Arbeit wurde die Milchsäure als ein in reichlicher Menge bei der künstlichen Durchströmung der überlebenden Leber auftretendes Abbauprodukt von Kohlenhydraten, insbesondere von Glykogen und von Traubenzucker erkannt.

Außerdem wurde erwiesen, daß auch d-l-Alanin bei der Durchblutung der Leber in Milchsäure übergeht. Hiermit war die Herkunft der Milchsäure, die fraglos ein normales, intermediäres Stoffwechselprodukt ist, bis zu einem gewissen Grade aufgeklärt.

Es lag nun nahe, zu untersuchen, ob unter denselben Versuchsbedingungen, unter denen das Auftreten von Milchsäure beobachtet wird, Glycerin gebildet wird. Besitzt doch diese Substanz ebenso wie die Milchsäure ein Skelett von drei Kohlenstoffatomen, kann sie doch ebenso wie die Milchsäure sicher vom Organismus neugebildet werden — wie daraus hervorgeht, daß verfütterte Seifen oder Fettsäuren im Tierkörper in Neutralfett umgewandelt werden können — und sind doch ihre strukturellen Beziehungen zu den Kohlenhydraten engere als die der Milchsäure.

Zudem ist durch neuere Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer[1]) sicher festgestellt, daß das bei der alko-

[1]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 1782, 1910.

holischen Gärung auftretende Glycerin als ein Abbauprodukt des Traubenzuckers anzusehen ist, und je mehr man sich mit Fragen des intermediären Stoffwechsels, insbesondere des Kohlenhydratstoffwechsels, befaßt, um so mehr kommt man zu der Erkenntnis der weitgehenden Analogien im pflanzlichen und tierischen Organismus.

Glycerin durfte um so eher als ein beim Kohlenhydratabbau entstehendes Produkt vermutet werden, als es offenbar in hervorragender Weise geeignet ist, das Material zum Aufbau des Traubenzuckers zu liefern, wie namentlich aus den Versuchen von Lüthje[1]) hervorgeht.

Die Beteiligung des Glycerinkomplexes beim Aufbau des Fettmoleküls ließ die Aufgabe, Glycerin als Abbauprodukt der Kohlenhydrate zu erweisen, besonders reizvoll erscheinen. Ich habe daher auf Veranlassung von Prof. Embden versucht, die Frage zu entscheiden: Wird bei der künstlichen Durchblutung der Leber Glycerin gebildet und läßt sich die Herkunft etwa gebildeten Glycerins aus Kohlenhydraten dartun?

Von vornherein mußte allerdings befürchtet werden, daß durch Spaltung von in der Leber und im Blut vorhandenen Glyceriden Glycerin in Freiheit gesetzt werden könnte.

Ich will gleich hier bemerken, daß es mir nicht gelungen ist, in eindeutiger Weise das Auftreten von Glycerin bei der Leberdurchblutung festzustellen. Wohl schien es, als ob eine solche Vermehrung der von vornherein im Blute vorhandenen geringen Glycerinmengen eher aufträte bei der Durchströmung der stark glykogenhaltigen als bei der der glykogenfreien Leber, aber die gefundenen Unterschiede waren zu gering, um aus ihnen bestimmte Schlüsse zu ziehen.

Die Anhäufung einer bestimmten intermediär auftretenden Substanz im Organismus und auch bei Durchblutungsversuchen ist natürlich abhängig von zwei Faktoren, nämlich von der Geschwindigkeit ihrer Bildung und derjenigen ihrer weiteren Umwandlung.

Vielleicht entging etwa intermediär gebildetes Glycerin in meinen Versuchen nur deswegen dem Nachweis, weil es noch rascher oder ebenso rasch, wie es auftrat, solchen Umwandlungs-

[1]) H. Lüthje, Über die Zuckerbildung aus Glycerin. Arch. f. klin. Med. 80, 101, 1905.

prozessen ausgesetzt war, mochten diese Prozesse nun in einem oxydativen Abbau, in einer synthetischen Verwendung — etwa unter Glyceridbildung — oder in irgendwelchen anderen Vorgängen bestehen.

Ganz von selbst gelangte ich somit zu der Frage: Wird dem Durchblutungsblute zugesetztes Glycerin in merklicher Menge zum Verschwinden gebracht? Diese Frage konnte ganz eindeutig in positivem Sinne beantwortet werden. Die Art der eintretenden Umwandlung wird wenigstens zu einem sehr wesentlichen Teil in der auf diese folgenden Arbeit von S. Oppenheimer aufgeklärt.

Methodik.

Zur Bestimmung des Glycerins in tierischen Flüssigkeiten sind bisher zwei Methoden angewandt worden: Die Destillation des Glycerins mit Wasserdampf im Vakuum und nachherige Titration mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure nach Nicloux von Ramond und Flandrin[1]) und die Isopropyljodidmethode nach Zeisel und Fanto von Tangl und Weiser[2]) sowie von Reach[3]).

Die Mängel des von Ramond und Flandrin angewandten Verfahrens sind von Tangl und Weiser ausführlich besprochen. Hier sei nur erwähnt, daß es zwar wahrscheinlich, aber keineswegs sicher ist, daß nach der Methode von Nicloux nur das Glycerin bestimmt wird und daß man andererseits das Glycerin quantitativ gewinnt.

Tangl und Weiser bedienten sich zur Isolierung des Glycerins aus Pferde- und Rinderblut folgenden Verfahrens:

Das zu analysierende Blut wurde unter fortwährendem Schütteln in der zwei- bis dreifachen Menge 96%igen Alkohols aufgefangen, nach mehrstündigem, manchmal tagelangem

[1]) Ramond et Flandrin, De l'absorption de la graisse dans l'intestin grêle. Compt. rend. Soc. Biol. 1, 169, 1904.

[2]) F. Tangl und St. Weiser, Über den Glyceringehalt des Blutes nach Untersuchungen mit dem Zeiselschen Jodidverfahren. Arch. f. d. ges. Physiol. 115, 152, 1906.

[3]) F. Reach, Über das Schicksal des Glycerins im Tierkörper. Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 1907, Nr. 20; diese Zeitschr. 14, 279, 1908.

Stehen abgesaugt und der Filterrückstand gründlich ausgewaschen und ausgepreßt. Der Alkohol wurde dann abdestilliert, bis die Flüssigkeit stark zu schäumen anfing und durch Eindampfen auf dem Wasserbade vollständig entfernt. Hierzu waren 5 bis 6 Stunden erforderlich. Aus der resultierenden wässerigen Flüssigkeit wurden nacheinander Eiweißreste, Fette, Sulfate und Phosphate entfernt.

Die Chloride wurden durch Eingießen in die vier- bis fünffache Menge absoluten Alkohols und darauffolgende Behandlung des Filtrates mit frisch gefälltem Silberoxyd beseitigt. Nach vollständiger Vertreibung des Alkohols wurde der Rückstand auf die vorgeschriebenen 5 ccm eingeengt und dem Zeisel-Fantoschen Jodidverfahren unterworfen.

Gegen die Anwendung des Tangl-Weiserschen Verfahrens spricht ein gewichtiges Bedenken. Das Filtrat der alkoholischen Blutfällung zeigt sehr deutlich alkalische Reaktion. Da es zugleich noch die Hauptmasse des Fettes und der Phosphatide des Blutes enthält und mehrere Stunden der Wasserbadtemperatur ausgesetzt wird, ist der Verdacht nicht von der Hand zu weisen, daß während dieser Zeit Glycerin aus gepaarten Verbindungen in Freiheit gesetzt und mitbestimmt wird. Ich suchte daher nach einem Verfahren, das diese Übelstände vermeidet, und gelangte schließlich zu folgender Arbeitsweise[1]).

Das zu untersuchende Blut — eventuell der Organbrei — wurde zunächst durch Fällen mit Salzsäure und Sublimat nach Schenck enteiweißt. Nach mindestens 12stündigem Stehen im Eisschrank wurde von dem Niederschlag, der zugleich das gesamte Fett enthält, abgesaugt und das Filtrat durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und durchlüftet. Das Schwefelquecksilber wurde abfiltriert.

Gemessene Mengen des Filtrates wurden mit 33°/₀iger Natronlauge genau neutralisiert und im Faustschen Verdunstkasten bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur bis zur eben beginnenden Kochsalzausscheidung eingeengt. Man kann diese Operation durch eine Vakuumdestillation bei 40° des

[1]) Das Verfahren hat inzwischen einige Verbesserungen erfahren und wird in seiner neuen Form in einer untenstehenden Arbeit von Embden, Schmitz und Baldes beschrieben werden.

Wasserbades ersetzen. Daß hierbei ebensowenig wie bei dem Einengen im Faustschen Verdunstkasten wesentliche Glycerinverluste eintreten, wurde an Lösungen von bekanntem Gehalt kontrolliert.

Die eingeengte Flüssigkeit, deren Volumen ungefähr $^{1}/_{10}$ der ursprünglichen Filtratmenge beträgt, wurde so lange mit käuflichem absolutem Alkohol versetzt, als noch erhebliche Salzmengen ausfielen. Im allgemeinen genügte das vier- bis fünffache Volumen der wässerigen Flüssigkeit. Die ausgefällten Salze wurden abgesaugt und mit absolutem Alkohol gründlich nachgewaschen.

Das Gesamtfiltrat wurde im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers auf ungefähr 20 ccm eingeengt. In den Kolben wurden dann 200 ccm Alkohol gebracht und langsam 100 ccm Äther zugesetzt. Von der feinpulverigen Fällung wurde abgesaugt und mit Alkoholäthermischung 2:1 nachgewaschen. Bei zu raschem Zusatz des Äthers kann es zur Ausfällung einer wässerigen Salzlösung kommen, die wegen möglicher Glycerinverluste vermieden werden muß.

Das zweite Filtrat wurde in gleicher Weise auf 10 bis 15 ccm eingeengt, mit 100 ccm Alkohol verdünnt und mit 100 ccm Äther gefällt. Es bildete sich meist nur noch ein geringer Niederschlag, der abfiltriert und mit einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther gewaschen wurde.

Das Filtrat wurde abermals im Vakuum eingeengt und der Rückstand mit 150 ccm Wasser in eine Schale gespült. Zur Entfernung des Alkohols wurde die Flüssigkeit unter häufigem Abspritzen der Schalenränder auf 50 ccm eingedampft, wieder mit 100 ccm Wasser versetzt und nochmals auf 50 ccm eingeengt. Es resultierte eine klare Lösung, die nur noch Spuren von Chloriden enthielt und manchmal durch wenige Flocken einer Verunreinigung getrübt war. Sie wurde in ein Kölbchen des Stritarschen Apparates filtriert, unter Überleiten eines kräftigen Luftstromes auf 5 ccm eingeengt und dem Zeisel-Fantoschen Verfahren unterworfen.

Die milde Art der vorgenommenen Operationen macht es sicher, daß bei Anwendung meines Verfahrens kein Glycerin aus gepaarten Verbindungen frei wird. Daß andererseits das

vorhandene Glycerin in befriedigender Ausbeute gewonnen wird, ergab sich aus folgenden Kontrollversuchen.

1. 2 l Rinderblut wurden nach Schenck enteiweißt und von dem entquecksilberten Filtrat zwei Portionen zu 3,6 l, entsprechend 600 ccm Blut, verarbeitet

	1.	2.
Gewogen AgJ in Gramm . . .	0,0330	0,0292
Berechnet Glycerin		
in Gramm	0,0129	0,0115
in Prozent	0,0021	0,0019

1 l desselben Blutes wurde mit 10 ccm einer wässerigen Glycerinlösung versetzt, deren Gehalt nach dem Zeisel-Fantoschen Verfahren zu 2,1560% gefunden war. 1500 ccm des entquecksilberten Filtrates, entsprechend 250 ccm Blut, lieferten 0,1370 g AgJ = 0,0537 g Glycerin. Zugesetzt waren 0,0539 g, im Blut enthalten 0,0050 g Glycerin, so daß von 58,9 mg 53,7 mg oder 91,2% wiedergefunden wurden.

2. 1800 ccm entquecksilbertes Filtrat von Schweineblut, entsprechend 300 ccm Blut, lieferten 0,0178 g AgJ = 0,0069 g Glycerin. 600 ccm desselben Blutes erhielten einen Zusatz von 0,0430 g Glycerin in 2 ccm Wasser und wurden dann sofort nach Schenck gefällt. 1800 ccm des entquecksilberten Filtrates, entsprechend 300 ccm Blut, lieferten 0,0694 g AgJ = 0,0272 g Glycerin.

Vorhanden waren 0,0215 + 0,0069 = 0,0284 g Glycerin. Gefunden wurden 0,0272 g = 95,6%.

Bei Anwendung der Methode wird also zugesetztes Glycerin ebenso vollständig wiedergefunden, wie bei dem Tangl-Weiserschen Verfahren.

Glycerinphosphorsäure und ihre Salze gehen, wie der folgende Versuch zeigt, nicht in die Endflüssigkeit über.

Zwei Portionen zu 500 ccm Schweineblut, von denen die eine (2) mit 2 g Glycerinphosphorsäure versetzt war, wurden nach Schenck gefällt und je 1200 ccm entquecksilbertes Filtrat verarbeitet.

	1	2
Gewogen AgJ in Gramm . . .	0,0143	0,0136
Gefunden Glycerin in Gramm .	0,0056	0,0053

Eine Unvollkommenheit der Methode besteht darin, daß bei den von mir angewandten Alkoholätherkonzentrationen in den Endflüssigkeiten Spuren von Zucker nachzuweisen waren. Nun haben zwar Zeisel und Fanto schon die Unschädlichkeit kleiner Traubenzuckermengen für ihr Verfahren erwiesen. Es stellte sich jedoch heraus, daß bei Anwesenheit größerer Traubenzuckermengen (die Kontrollversuche wurden mit Traubenzucker Marke Kahlbaum ausgeführt) ein kleiner Jodsilberniederschlag auftritt, besonders wenn man das Erhitzen längere Zeit fortsetzt. In den vorliegenden Versuchen dürfte dieser Fehler keine große Rolle gespielt haben, da die in den Endflüssigkeiten vorhandenen Traubenzuckermengen nur gering waren.

Es ist jedoch inzwischen gelungen, auch diese kleinen Zuckermengen fast vollständig zu beseitigen. (Siehe die schon erwähnte Arbeit von Embden, Schmitz und Baldes.)

Über die Anordnung meiner Tierversuche kann ich mich kurz fassen, da sowohl bei der Vorbereitung der Tiere als bei dem eigentlichen Versuche von der im hiesigen Institut üblichen, in der vorangehenden Arbeit von Embden und Kraus beschriebenen Methodik in keiner Weise abgewichen wurde.

Es sei nur erwähnt, daß das zur Ermittelung des Anfangswertes bestimmte Blut (A) bis unmittelbar vor Beginn des Versuches im Apparate zirkulierte. In den Versuchen mit Glycerinzusatz wurde die Substanz zu der gesamten im Apparat zirkulierenden Blutmenge zugefügt.

Als Endwert des Glycerins wurde in diesen Versuchen die Summe aus dem Glyceringehalt des nach dem Versuch im Apparat verbliebenen Blutes (B) und dem der zerkleinerten Leber in Rechnung gesetzt. Das Volumen des Blutes B ergab sich durch Subtraktion der beträchtlichen Gewichtszunahme, die die Leber während des Versuches erfuhr, von derjenigen Blutmenge, die nach Entnahme von A im Apparat verblieben war.

Die für den Glyceringehalt der Leber angegebenen Werte sind wahrscheinlich etwas zu hoch, da es nach Unterbrechung der Zirkulation sehr schnell zu einer fermentativen Spaltung der Fette kommt.

Der Glyceringehalt des normalen Rinder-, Schweine- und Hundeblutes.

Außer den zur Prüfung der Methode ausgeführten, oben erwähnten Analysen und den A-Bestimmungen der Durchblutungsversuche an glykogengemästeten und glykogenfreien Lebern sind noch zwei ohne Beziehung zu Tierversuchen unternommene Untersuchungen zu erwähnen.

1. 4,2 l entquecksilbertes Filtrat von Rinderblut, entsprechend 700 ccm Blut, lieferten 0,0436 g AgJ, entsprechend 0,0171 g oder 0,0024 % Glycerin.

2. 400 ccm durch Venaepunktion entnommenes Blut von zwei Hunden wurde sofort nach Schenck gefällt. 1800 ccm entquecksilbertes Filtrat = 300 ccm Blut lieferten 0,0290 g AgJ = 0,0114 g oder 0,0038 % Glycerin.

Insgesamt wurden für Rinderblut die folgenden Werte ermittelt:

0,0021 %
0,0019 %
0,0024 %
0,0019 % (Versuch 6)
0,0018 % } („ 7)
0,0017 % }

Als Mittel der 6 Bestimmungen ergibt sich der Wert von 0,0019 %.

Für Schweineblut waren meine Zahlen:

0,0047 % (Versuch 8)
0,0035 % } („ 9)
0,0029 % }
0,0037 % („ 1)
0,0043 % („ 2)
0,0048 % („ 3)
0,0047 % („ 4)
0,0032 % („ 5)

im Mittel aus 8 Bestimmungen 0,0038 %.

Von allen diesen Werten nähert sich keiner der von Tangl und Weiser als Durchschnittsgehalt des Rinderblutes angegebenen Zahl von 0,0070 %. Hierdurch dürfte die Vermutung,

daß bei ihrer Arbeitsweise Glycerin aus Fett oder anderen gepaarten Verbindungen in Freiheit gesetzt wurde, an Wahrscheinlichkeit gewinnen.

Versuche über die Bildung von Glycerin aus Kohlenhydrat bei der Leberdurchblutung.

Zur Entscheidung der Frage nach der Bildung von Glycerin aus Kohlenhydrat in der überlebenden Leber war zunächst zu prüfen, welchen Einfluß die künstliche Zirkulation der glykogenfreien Leber auf den Glyceringehalt des Durchströmungsblutes ausübt. Diesem Zwecke dienen die Versuche 1 bis 5 (Tab. I).

In den vier ersten Versuchen waren die Tiere durch 72 stündigen Hunger und darauffolgende Strychninvergiftung, im Versuch 5 durch $4^1/_2$ tägige Phlorizinvergiftung vorbereitet. In den Versuchen 1 bis 4 wurde die nahezu völlige Glykogenfreiheit der Leber durch eine Bestimmung nach Pflüger kontrolliert. In allen Versuchen kam Schweineblut zur Verwendung.

Tabelle I.

Nr.	Gewicht des Hundes kg	Gewicht der Leber vor dem Versuch g	Blutmenge ccm	Dauer Std.	Glyceringehalt in Blut A %	Blut B %	Leber %
1	7,7	160	1700	2	0,0037	0,0032	0,0082
2	8,0	158	1600	2	0,0043	0,0032	0,0166
3	6,3	155	1600	2	0,0048	0,0032	verloren
4	6,7	175	1600	2	0,0047	0,0032	0,0150
5	8,6	230	1800	2	0,0032	0,0020	0,0209

Alle Versuche zeigen übereinstimmend ein nicht unerhebliches Zurückgehen des Glyceringehaltes im Blut, um 13 % (Versuch 1) bis 33 % (Versuch 3) des Anfangswertes. In der durch Strychnin- oder Phlorizinvergiftung glykogenfrei gemachten Leber findet also sicher keine den Verbrauch übersteigende Produktion von Glycerin statt, und die Durchblutungsmethode erweist sich damit geeignet zur Untersuchung der vorliegenden Fragestellung.

Das nächste Untersuchungsobjekt mußte die glykogengemästete Leber sein, da einmal über die Zwischenstufen zwischen Traubenzucker und Glycerin nichts bekannt ist und

andererseits das Glykogen der Leber sich in anderen Versuchen als reaktionsfähiger erwiesen hatte als zugesetzter Traubenzucker[1]).

Tabelle II faßt eine Reihe von Durchströmungsversuchen an der glykogengemästeten Hundeleber zusammen, von denen Nr. 6 und 7 mit Rinderblut, Nr. 8 und 9 mit Schweineblut ausgeführt wurden. Wo bei den einzelnen Versuchen zwei Zahlen untereinanderstehen, geben sie das Resultat von Doppelbestimmungen.

Tabelle II.

Nr.	Gewicht des Hundes	Gewicht der Leber vor dem Versuch	Blutart	Blutmenge	Dauer	Glyceringehalt in		
						Blut A	Blut B	Leber
	kg	g		ccm	Std.	%	%	%
6	5	230	Rinderblut	1600	2	0,0019	0,0019 0,0018	0,0055
7	9,3	385	Rinderblut	1600	2	0,0018 0,0017	0,0028 0,0032	0,0105
8	5,9	402	Schweineblut	1600	2	0,0047	0,0051	0,0138
9	3,9	245	Schweineblut	1600	2	0,0035 0,0029	0,0031 0,0022	0,0111

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei Gegenwart einer reichlichen Glykogenmenge eine Abnahme des Blutglycerins nicht stattfindet. Der Gehalt zeigt sogar in Versuch 7 eine merkliche Zunahme, ca. 12 mg pro Liter Blut.

Wenn vielleicht in diesen Versuchen ein Hinweis auf die Bildung von Glycerin aus Kohlenhydrat in der Leber gegeben war, so möchte ich ihnen doch in Anbetracht der Geringfügigkeit der beoachteten Unterschiede, die sich nie wesentlich von der Fehlergrenze der Bestimmung entfernen, keine entscheidende Bedeutung beimessen.

Aus Tabelle III, die die Versuche umfaßt, in denen ich dem Durchströmungsblut Glycerin zusetzte, geht nun hervor,

---

[1]) Embden und Kraus, Beitrag zur Lehre vom Abbau der Kohlenhydrate im Tierkörper. 26. Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden 1909. — Embden und Wirth, Über Hemmung der Acetessigsäurebildung in der Leber. Diese Zeitschr. 27, 17, 1910.

daß die Leber recht große Mengen Glycerin zu verarbeiten vermag. Die Werte schwanken zwischen 1,7759 g in Versuch 12 und 0,7460 g in Versuch 13.

Tabelle III.

Nr.	Gewicht des Hundes	Nettogewicht der Leber		Zugesetzte Glycerinmenge	Blutmenge		Glyceringehalt in			Glycerinabnahme		
		vor dem Versuch	nach d. Versuch		vor Beginn	B (zur Berechnung)	Blut A	Blut B	Leber	total	pro 1000 ccm Blut	% des Anfangswertes
	kg	g	g	g	ccm	ccm	%	%	%	g	g	
10	5,9	125	210	2	1600 Rinderblut	1515	0,1441	0,0339 0,0316	0,0672	1,6676	1,0420	72,7
11	4,0	113	253	2	1600 Rinderblut	1460	0,1215 0,1286	0,0571	0,0710 0,0732	0,8680	0,5425	43,7
12	6,6	171	290	7	1600 Rinderblut	1481	0,3642 0,3684	0,2376	0,1993	1,7759	1,1090	30,3
13	6,5	155	417	6	1600 Schweineblut	1338	0,3384 0,3377	0,2720 0,2638	0,2601 0,2567	0,7460	0,4662	13,7
14	5,3	150	295	10	1600 Schweineblut	1455	0,5556 0,5613	0,4519	0,4426 0,4390	1,0590	0,6620	11,7
15	7,0	116	228	5	1350 Hundeblut + 100 physiol. NaCl-Lösg. − 200 Blut A 1250	1138	0,1527 0,1531	0,2180 0,2134	0,1941 0,1858	0,9450	0,7480	24,6

Sämtliche Versuche dauerten 2 Stunden.

Die prozentisch stärksten Abnahmen sind in den Versuchen 10 und 11, die die kleinsten Zusätze erhielten, zu verzeichnen. Es zeigt sich jedoch, daß auch die absoluten Werte des Glycerinverbrauches bei kleinen Zusätzen derselben Größenordnung angehören, als die bei höheren Konzentrationen erreichten. Danach wird man annehmen dürfen, daß allmählich zugeführtes Glycerin von der Leber besonders leicht angegriffen werden kann, und es wird offenbar, daß bei der Durchblutung der abnorm glykogenreichen Leber eine recht beträchtliche Glycerinbildung aus Kohlenhydrat stattfinden kann, ohne sich in einem Ansteigen des Glyceringehaltes im Durchströmungsblut zu äußern.

Noch in dem schwächsten der Versuche, Nr. 13, ist mehr als das zehnfache der Glycerinmenge verschwunden, die in dem Ausgangsblute vor dem Glycerinzusatz angenommen werden

kann, und es würde also eine sehr energische Glycerinproduktion erforderlich sein, um diesen Wert zu erreichen oder zu übertreffen.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind folgende:

1. Der Glyceringehalt des Rinderblutes schwankte in meinen Versuchen zwischen 0,0017 und 0,0024 %, hatte also einen fast konstanten Wert.

Der Glyceringehalt des Schweineblutes erwies sich als etwas höher und zeigte etwas größere Schwankungen (0,0029 % bis 0,0048 %).

2. Bei Durchströmung der glykogenfreien Leber mit Schweineblut ohne Zusatz sinkt der an sich schon geringe Glyceringehalt des Blutes.

3. Bei der Durchströmung der stark glykogenhaltigen Leber mit Schweine- oder Rinderblut wurde eine Abnahme des Glyceringehaltes nicht beobachtet, aber auch keine außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegende Zunahme.

4. Dem Durchblutungsblut zugesetztes Glycerin wird von der Leber in außerordentlich hohem Maße zum Verschwinden gebracht.

Hierin dürfte die Erklärung dafür liegen, daß in meinen Durchblutungsversuchen ohne Zusatz nirgends eine erhebliche Zunahme des Glycerins beobachtet wurde.

Über Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber.

II. Mitteilung.

Von

Siegfried Oppenheimer.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In einer voranstehenden Arbeit[1]) wurde gezeigt, daß sich bei der künstlichen Durchblutung der stark glykogenhaltigen Hundeleber mit Rinderblut sehr erhebliche Milchsäuremengen bilden, so daß das Blut nach der Durchblutung sehr viel milchsäurereicher ist als vorher.

Hingegen konnte bei entsprechenden Versuchen an der völlig oder annähernd glykogenfreien Leber eine derartige Milchsäurebildung nicht beobachtet werden, und es trat sogar häufig eine Abnahme der Milchsäure während der Durchblutung ein.

Wurde es hierdurch schon sehr wahrscheinlich, daß in der isolierten Leber Kohlenhydrate in Milchsäure umgewandelt werden können, so ließ sich der endgültige Beweis hierfür durch Versuche erbringen, in denen dem Blute bei der Durchströmung der glykogenfreien Leber größere Mengen Traubenzucker zugesetzt wurde. Der zugesetzte Traubenzucker bewirkte auch in der glykogenfreien Leber eine deutliche Vermehrung der Milchsäure.

Das gleiche trat ein, wenn das Durchblutungsblut d-l-Alanin in größeren Mengen enthielt.

---

1) Embden und Kraus, Über die Milchsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber. I. Mitteilung. Diese Zeitschr. **45**, 1, 1912.

Es lag nun nahe, weitere Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Milchsäurebildung in der annähernd glykogenfreien Leber zu untersuchen.

In erster Linie habe ich mein Augenmerk auf zwei Zuckerarten, die Lävulose und die Arabinose, gerichtet; weitere Versuche wurden mit Glycerin und mit Inosit angestellt.

Bezüglich der Ausführung der Tierversuche kann ich mich im allgemeinen ganz auf die in der voranstehenden Arbeit von von Embden und Kraus gemachten Angaben beziehen.

Es sei hier nur erwähnt, daß die Durchblutung in allen Fällen mit 1700 ccm Rinderblut erfolgte und 2 Stunden dauerte, soweit es bei den Einzelversuchen nicht ausdrücklich anders vermerkt ist. Überall wurde auch in meinen Versuchen vor der Durchblutung ein kleiner Kontrollappen von der Leber abgebunden und nach der Pflügerschen abgekürzten Methode auf Glykogen untersucht. Es fanden sich in keinem der Fälle irgendwie in Betracht kommende Mengen Glykogen. In sämtlichen Versuchen, in denen ich dem Blute zugesetzte Substanzen auf ihre Fähigkeit Milchsäure zu bilden untersuchen wollte, waren die Tiere in der von Embden früher geschilderten Weise nach einer 3 bis 4tägigen Karenzperiode mit Strychnin vergiftet worden.

Nur in einigen meiner Versuche ohne Zusatz von Substanz zum Durchblutungsblut sah ich von der Strychninisierung ab und konnte die in einer voranstehenden Arbeit von Embden und Kraus gemachte Angabe, daß einfacher 4tägiger Hunger ohne Strychninvergiftung genügt, um die Milchsäurebildung bei der Durchblutung ohne Zusatz zu verhindern, bestätigen.

Ich möchte hier noch eine Erfahrung hervorheben, die namentlich für eine etwaige Nachprüfung der von Embden und Kraus und von mir gewonnenen Ergebnisse von wesentlicher Bedeutung ist. Nachdem in einer sehr großen Zahl älterer und neuerer Versuche bei der Durchblutung der glykogenfreien Leber ohne Zusatz oder unter Zusatz nicht milchsäurebildender Substanzen niemals eine Vermehrung der Milchsäure eingetreten war, erhielt ich plötzlich dieser Erfahrung direkt widersprechende Ergebnisse. Auch hier handelte es sich um 2stündige Durchblutungsversuche. Das Durchblutungsblut hatte bereits vor Beginn des Versuchs 30 bis

60 Minuten bei 40° zirkuliert, so daß es im ganzen ca. $2^1/_2$ bis 3 Stunden auf Körpertemperatur erwärmt wurde. Es stellte sich schließlich heraus, daß in diesen Versuchen offenbar die Milchsäurebildung auf bakterielle Verunreinigung zurückzuführen war. Ich erhielt ganz regelmäßig wieder die gleichen gesetzmäßigen Resultate wie früher, als der Durchblutungsapparat gründlich mit Formalinlösung sterilisiert worden war, eine Maßnahme, die neuerdings im hiesigen Institut vor jedem Durchblutungsversuch durchgeführt wird. Die eben erwähnte Erfahrung fordert jedenfalls dazu auf, Durchblutungsversuche stets auf eine möglichst kurze Zeit zu beschränken.

Nicht ganz unwesentlich war es vielleicht, daß ich das vor der Durchströmung zu untersuchende Blut (Blut A) zusammen mit dem für die Durchblutung bestimmten (Blut B) bis unmittelbar vor dem Beginn des Durchströmungsversuchs im Durchblutungsapparat zirkulieren ließ. Es verändert nämlich das Blut schon während des einfachen Stehens namentlich bei Körpertemperatur seinen Milchsäuregehalt merklich[1]).

Auch die chemische Methodik war im Prinzip genau dieselbe wie in der voranstehenden Arbeit; die Ätherextraktionen wurden sämtlich mittels des Lindschen rotierenden Extraktionsapparates vorgenommen, der sehr viel rascher als der Kutscher-Steudelsche Apparat arbeitet. In jedem einzelnen Falle kontrollierte ich die Vollständigkeit der ersten Extraktion, die etwa 20 bis 24 Stunden dauerte, durch eine weitere Extraktion von etwa 6stündiger Dauer. War in diesem zweiten Ätherextrakt noch Milchsäure nachweisbar (es handelte sich stets höchstens um Spuren), so wurde noch eine dritte Ätherextraktion angesetzt. Wurde bei der zweiten Extraktion noch Milchsäure gefunden, so wurde diese Extraktion in der in der vorigen Arbeit geschilderten Weise weiterverarbeitet und die schließlich gewonnene Lösung von Zinklactat mit dem aus dem ersten Extrakt erhaltenen Zinksalz vereinigt.

Eine weitere nicht ganz unwesentliche Verbesserung des Verfahrens, die in meinen späteren Versuchen zur Anwendung kam, bestand darin, daß das Blut bzw. der Leberextrakt vor

[1]) Siehe H. Fries, Über das Vorkommen von Milchsäure im menschlichen Blute. Inaug.-Diss. Marburg 1911, sowie die weiter unten stehenden Arbeiten von Brigitte Kraske, Kura Kondo usw.

der Extraktion mit Ammonsulfat in Substanz völlig oder annähernd gesättigt wurde. War die auf diese Weise erzielte Beschleunigung der Extraktion auch nicht sehr erheblich, so kam sie doch bei der großen Zahl der für die vorliegenden Untersuchungen notwendigen Milchsäurebestimmungen wesentlich in Betracht.

Sehr viel zuverlässigere Resultate erhielt ich dadurch, daß ich mich in fast allen meinen Versuchen nicht auf die Wägung des schließlich gewonnenen Zinksalzes beschränkte.

Dieses Zinksalz ist in gewissen Fällen zwar annähernd reines Lactat, in anderen Fällen aber so hochgradig verunreinigt, daß aus der bloßen Wägung bindende Schlüsse auf die vorhandene Milchsäuremenge nicht gezogen werden können. Ich habe daher das gewogene Zinksalz wieder aufgelöst und darin vorhandene Milchsäure nach dem Verfahren von v. Fürth und Charnaß in Acetaldehyd übergeführt, der, wie es die eben genannten Autoren angegeben haben, nach Ripper titrimetrisch bestimmt wurde. In mehreren Fällen habe ich mich damit begnügt, das wie in den übrigen Versuchen gewonnene Zinksalz ohne vorhergehende Wägung nach dem von v. Fürth-Charnaßschen Verfahren direkt zu bestimmen.

Es ist im hiesigen Institut durch eine bisher unveröffentlichte Untersuchungsreihe, die von Herrn Apotheker Schmidt begonnen und von Herrn Dr. Max Oppenheimer fortgeführt wurde, gelungen, das Verfahren von v. Fürth und Charnaß ganz wesentlich zu verbessern.

Dieses verbesserte Verfahren ist durch Embden im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden (Bd. V, S. 1256) beschrieben worden, so daß ich hier von einer nochmaligen Wiedergabe absehen kann.

Die Kontrolle der durch Wägung des Zinklactates ermittelten Milchsäurewerte durch das titrimetrische Verfahren zeigte, daß das gewogene Zinksalz von recht verschiedener Reinheit war. Wohl in allen Fällen waren Verunreinigungen vorhanden; sie waren im Blut B, d. h. im Blute nach der Durchströmung, prozentisch am geringsten in den Fällen, in denen bei der Durchblutung eine starke Milchsäurebildung stattgefunden hatte, am größten, wo während der Durchströmung keine Vermehrung der Milchsäure oder gar eine Verminderung eingetreten war.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A gewonnene Menge Zinklactat g	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B gewonnene Menge Zinklactat g	Aus der Wägung des Zinksalzes berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Aus der titrierten Aldehydmenge berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Durch Titration erhaltene Milchsäuremenge in Prozenten der durch Wägung erhaltenen in		Zu- oder Abnahme der Milchsäure nach der Durchblutung		Aus 1200 ccm Filtrat der durchbluteten Leber gewonnene Menge Milchsäure g	Bemerkungen
					Blut A g	Blut B g	Blut A g	Blut B g	Blut A %	Blut B %	a) in g pro 1000 ccm Blut g	b) in % des Ausgangswertes %		
1	319	—	0,101 0,104	0,092 0,086	0,374 0,385	0,340 0,318	0,240 0,257	0,191 0,194	64 67	56 61	— 0,056	— 22	—	Vgl. die vorstehende Arbeit von Embden und Kraus, Tab. I, Versuch 2 und 3.
2	130	—	— 0,133	— 0,096	— 0,492	— 0,355	0,360 0,294	0,164 0,193	— 60	— 56	— 0,148	— 45	0,130	A I und B I ohne vorherige Wägung in Aldehyd übergeführt.
3	200	—	— —	— —	— —	— —	0,207 0,205	0,189 0,224	— —	— —	± 0	± 0	0,080	A und B ohne vorherige Wägung in Aldehyd übergeführt.
4	—	—	— —	— —	— —	— —	0,348 0,388	0,169 0,172	— —	— —	— 0,198	— 54	0,032	do.
4a	145	—	— —	— —	— —	— —	0,261 0,281	0,063 0,065	— —	— —	— 0,207	— 76	—	Milchsäuregehalt in 1000 ccm Blut nach 1 Stunde auf Grund der Titration = 0,040 g
4b	142	—	— —	— —	— —	— —	0,310 0,308	0,245 0,241	— —	— —	— 0,056	— 18	—	Die Durchblutung dauerte nur 60 Minuten.
4c	213	—	— —	— —	— —	— —	0,333 0,337	0,199 0,175	— —	— —	— 0,148	— 44	—	Milchsäuregehalt in 1000 ccm Blut nach 1 Stunde auf Grund der Titration = 0,150 g.

Bei der Besprechung meiner Ergebnisse will ich mit den 7 Leerversuchen (Versuch 1 bis 4c, Tabelle I) beginnen, von denen die beiden ersten bereits durch Embden und Kraus als Versuch 3 und 4 (Tabelle I) veröffentlicht wurden.

Die notwendigen Einzelheiten der Durchblutungsversuche sind, soweit sie nicht oben angegeben wurden, aus dem Stab 2 und 3 dieser Tabelle ersichtlich. Aus Kolonne 4 und 5 geht die Menge des aus 1200 ccm Filtrat von Blut A und von Blut B (entsprechend 200 ccm Blut) gewonnenen wasserfreien Zinksalzes hervor. In Kolonne 6 und 7 finden sich die aus den Ergebnissen dieser Wägungen berechneten Mengen Milchsäure pro Liter Blut, während Kolonne 8 und 9 die auf Grund der Aldehydüberführungmethode gewonnenen Milchsäuremengen pro Liter Blut angeben.

Die titrimetrisch ermittelten Werte, die im Gegensatz zu den zu hohen Werten der gravimetrischen Methode als etwas zu niedrig anzusehen sind, sind der Berechnung der Änderung des Milchsäuregehalts im Blut während der Durchströmung zugrunde gelegt.

Kolonne 12 gibt die Milchsäurezu- resp. -abnahme in Gramm pro Liter Blut, Kolonne 13 die Zu- oder Abnahme der Milchsäure im Blut nach der Durchströmung in Prozenten des Milchsäuregehaltes des Blutes vor der Durchströmung an.

In den Versuchen 3 bis 4c wurden die Milchsäurebestimmungen ausschließlich auf titrimetrischem Wege vorgenommen.

Die in Kolonne 14 niedergelegten Lactatwerte für 1200 ccm Leberfiltrat sind, soweit sie überhaupt angegeben werden, nur durch Wägung des Zinksalzes ermittelt, also nach dem schon Gesagten als etwas zu hoch anzusehen.

In einer Reihe von Fällen wurden bei der Verarbeitung der Leber weniger als 1200 ccm Filtrat gewonnen. In der Tabelle (Kolonne 14) sind die schließlich gewonnenen Lactatwerte der besseren Übersicht wegen sämtlich auf 1200 ccm umgerechnet.

Fast sämtliche Milchsäurebestimmungen am Blute wurden, mindestens bis zur Wägung des Zinksalzes, doppelt ausgeführt; in der Tabelle ist das Resultat jeder einzelnen Bestimmung, da, wo Doppelbestimmungen ausgeführt wurden, beide Bestimmungen untereinander, angegeben. Die Überführung in Aldehyd wurde nur in einem Teile der Fälle doppelt ausgeführt.

Das eben Gesagte gilt nicht nur für die in Tabelle I, sondern auch für die in den folgenden Tabellen niedergelegten Versuchsergebnisse.

Bei der Betrachtung der Tabelle I wollen wir zuerst unser Augenmerk auf die Kolonnen 8 und 9 richten, aus denen die im Liter Blut vor der Durchblutung (Blut A, Kolonne 8) und nach der Durchblutung (Blut B, Kolonne 9) vorhandene Milchsäuremenge hervorgeht. Es handelt sich hier um die mittels der Aldehydmethode ermittelten Werte. Alle diese Bestimmungen sind doppelt ausgeführt, und wenn die Doppelbestimmungen zum Teil auch untereinander nicht besonders gut stimmen, so geht doch mit Sicherheit aus diesen Versuchen hervor, daß, ganz in Übereinstimmung mit den in der voranstehenden Arbeit von Embden und Kraus gewonnenen Ergebnissen, eine Vermehrung der Milchsäure während der Durchströmung der glykogenfreien Leber ohne Zusatz zum Durchblutungsblute nicht stattgefunden hat. Im Gegenteil, nimmt man aus den Doppelbestimmungen jeweils das arithmetische Mittel und vergleicht die so gewonnenen Zahlen für A und B miteinander, so bemerkt man (Kolonne 12 und 13), daß in 6 von den 7 Versuchen der Tabelle I eine merkliche Abnahme der Milchsäure bei der Durchblutung eingetreten ist, die zwischen 56 mg pro Liter Blut in Versuch 1 und 4b und 207 mg in Versuch 4a schwankt.

Die Abnahme in Prozenten des Ausgangswertes wechselt zwischen 18 und 76°/₀. In einem Versuche (Versuch 3) ist die Milchsäuremenge in Blut A und Blut B annähernd die gleiche.

Meine Versuche an der glykogenfreien oder äußerst glykogenarmen Leber ohne Zusatz zum Durchblutungsblute führten also zu denselben Ergebnissen, wie die entsprechenden Untersuchungen von Embden und Kraus, wenn ich von den oben erwähnten Versuchen, in denen offenbar bakterielle Verunreinigungen eingetreten waren, absehe.

Des weiteren nahm ich zunächst Durchströmungsversuche mit Lävulose vor, um zu ermitteln, ob diese Zuckerart ähnlich wie Traubenzucker in der künstlich durchbluteten Leber Milchsäure zu bilden vermöchte. Die Menge der zugesetzten Lävulose schwankte, wie aus Tabelle II, Kolonne 3 hervorgeht, zwischen 10 und 15 g.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nr. des Versuchs	Gewicht d. Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A gewonnene Zinklactatmenge g	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B gewonnene Zinklactatmenge g	Aus d. Wägung d. Zinksalzes berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut Blut A g	Blut B g	Aus d. titrierten Aldehydmenge ber. Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut Blut A g	Blut B g	Durch Titration erhaltene Milchsäuremenge in Prozenten der durch Wägung erhaltenen in Blut A %	Blut B %	Zu- oder Abnahme d. Milchsäure nach der Durchblutung a) pro 1000 ccm Blut g	b) in % des Ausgangswertes	Aus 1200 ccm Filtrat d. durchbluteten Leber gewonnene Milchsäuremenge g	Bemerkungen
5	ca. 115	10 g Lävulose	0,075 0,066	0,207 0,226	0,278 0,244	0,767 0,837	— 0,180	— 0,737	— 74	— 88	+0,557	+ 310	—	
6	215	15 g Lävulose	0,094 0,090	0,312 0,314	0,348 0,333	1,155 1,163	—	—	—	—	[+0,820	+ 242]	0,209	{Zunahme berechnet nach Wägungsresultaten.
7	223	15 g Lävulose	0,046 0,077	0,294 0,288	0,170 0,285	1,088 1,066	0,115 —	0,854 —	68	78	+0,739	+ 643	0,301	
8	—	15 g Lävulose	0,154 0,167	0,621 0,628 0,509	0,570 0,618 —	2,295 2,325 1,885	0,465 — —	— — 1,719	83 — —	91 — —	+1,254	+ 269	0,698	

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nr. des Versuchs	Gewicht d. Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A gewonnene Zinklactatmenge g	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B gewonnene Zinklactatmenge g	Aus d. Wägung d. Zinksalzes berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut Blut A g	Blut B g	Aus d. titrierten Aldehydmenge ber. Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut Blut A g	Blut B g	Durch Titration erhaltene Milchsäuremenge in Prozenten der durch Wägung erhaltenen in Blut A %	Blut B %	Zu- oder Abnahme d. Milchsäure nach der Durchblutung a) pro 1000 ccm Blut g	b) in % des Ausgangswertes	Aus 1200 ccm Filtrat d. durchbluteten Leber gewonnene Milchsäuremenge g	Bemerkungen
9	170	10 g Arabinose	0,102 0,094	0,100 0,071	0,378 0,348	0,370 0,263	0,245 0,261	0,163 0,164	65 75	44 62	—0,090	—35	—	Siehe die mangelhafte Übereinstimmung einzelner Doppelbestimmungen
10	216	10 g Arabinose	0,136 0,178	0,066 0,076	0,503 0,659	0,244 0,281	0,410 0,407	0,075 —	82 62	31 —	—0,333	—82	0,082	

In allen 4 Versuchen der Tabelle II (Versuch 5 bis 8), die, vom Lävulosezusatz abgesehen, in genau derselben Weise wie die der vorhergehenden Tabelle angestellt wurden, trat eine ganz beträchtliche Vermehrung der Blutmilchsäure ein.

Die Milchsäurezunahme im Liter des Durchblutungsblutes (Kolonne 12) schwankt zwischen 557 mg in Versuch 5 und 1254 mg in Versuch 8, die auf den Ausgangswert bezogene prozentische Zunahme zwischen 242% in Versuch 6 und 643% in Versuch 7.

Das sind Werte, die ganz erheblich größer sind als diejenigen, die Embden und Kraus bei der Durchströmung der glykogenfreien Leber mit Traubenzucker erzielten. Es ist also anscheinend die Lävulose in der künstlich durchbluteten Leber merklich leichter angreifbar als der Traubenzucker, was mit ihrem Verhalten beim schweren Diabetes im besten Einklang steht.

Noch etwas anderes möchte ich an den Lävuloseversuchen erörtern. Die Doppelbestimmungen stimmen sowohl für das Blut A wie für das Blut B des öfteren um mehrere Zentigramme nicht überein. Bei den höheren Werten in Blut B sind trotzdem die prozentischen Unterschiede zwischen den am gleichen Material vorgenommenen Doppelbestimmungen keine sehr erheblichen, während bei den zum Teil sehr geringen, bei Blut A ermittelten Werten dieser Tabelle dieser Fehler sehr stark ins Gewicht fällt. Das Gesamtresultat dieser Versuche wird aber hierdurch in keiner Weise beeinflußt.

Das aus Blut B gewonnene Zinklactat war von vornherein zum größten Teil sehr gut krystallisiert und wenig gefärbt. Dem entspricht es, daß auch die Aldehydausbeute aus dem gewonnenen Zinksalz eine relativ gute war.

In den 3 Versuchen, in denen die Permanganatmethode angewandt wurde (Versuch 5, 7 und 8), betrug der nach dem von Fürth-Charnaßschen Verfahren ermittelte Wert für Milchsäure im Blut B in Prozenten der durch Wägung des Zinksalzes gewonnenen Resultate 88, 78 und 91%, während die entsprechenden Zahlen für Blut A nur 74, 68 und 83% betrugen.

Es war also in diesen Fällen das aus Blut B gewonnene Zinksalz reiner als das aus Blut A isolierte, oder anders aus-

gedrückt: es hatten die das Zinklactat verunreinigenden Substanzen während der Durchblutung nicht oder nicht in demselben Maße zugenommen wie die Milchsäure.

Ganz anders liegen die Verhältnisse in den oben besprochenen Leerversuchen, wo offenbar, wie aus den Kolonnen 10 und 12 der Tabelle I, Versuch 1 und 2 hervorgeht, die Verunreinigung des Zinklactats im Blut B stärker war als im Blut A.

Es war von Wichtigkeit, auch bei den Lävuloseversuchen die Natur der gebildeten Milchsäure festzustellen. Ich habe daher das aus Blut B mehrerer Lävuloseversuche isolierte Zinksalz durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt und zu einer polarimetrischen Bestimmung verwendet.

Das Material war zur Entfernung des Krystallwassers bis zur Gewichtskonstanz bei annähernd 110° getrocknet worden.

1,0888 g des wasserfreien Zinksalzes wurden in destilliertem Wasser gelöst.

Gewicht der Lösung: 18,5076 g, das spezifische Gewicht $d = 1{,}033$ bei 16°.

Die Flüssigkeit wurde im 2 dcm-Rohr bei 30° polarisiert.

$$\alpha = -0{,}80^{\circ}.$$

Daraus berechnete Größe für

$$[\alpha]_D \text{ bei } 30^{\circ} = -6{,}58^{\circ},$$

während Hoppe-Seyler und Araki[1]) für eine ähnlich konzentrierte Lösung von Zinklactat eine spezifische Drehung von etwas mehr als — 6,8° ermittelten.

Das durch Umkrystallisieren gereinigte Zinklactat bestand also nur aus dem Salz der Rechtsmilchsäure.

Die beiden Hexosen, die sich in einer voranstehenden und in dieser Arbeit als Milchsäurebildner erwiesen, sind im tierischen Organismus leicht verbrennlich. Es war nun von besonderem Interesse, auch die Einwirkung eines im Tierkörper schwerverbrennlichen Zuckers auf die Milchsäurebildung in der Leber kennen zu lernen.

---

[1]) Hoppe-Seyler und Araki, Über die Einwirkung der bei Sauerstoffmangel im Harn ausgeschiedenen Milchsäure auf polarisiertes Licht und die Rotationswerte aktiver Milchsäure im allgemeinen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 371, 1895.

Ich wählte zu diesem Zwecke zunächst den 5-Kohlenstoffzucker l-Arabinose, mit dem ich zwei Versuche (Tabelle III) anstellte.

Es ist ohne weiteres aus den Kolonnen 4 und 5 sowie 8 und 9 ersichtlich, daß in beiden Fällen die Milchsäure nicht zunahm. Im Versuch 9 ist eine geringe Abnahme zu erkennen, die sich allerdings annähernd innerhalb der Fehlergrenzen dieser Bestimmung hält, während in Versuch 10 die Verminderung der Milchsäure während der Durchblutung außer Zweifel steht.

Arabinose verhält sich also bezüglich der Milchsäurebildung in der Leber gänzlich anders wie Dextrose und Lävulose.

Es wäre natürlich von großer Wichtigkeit, derartige Untersuchungen auch auf andere Zuckerarten auszudehnen. Ich habe es aber zunächst vorgezogen, weitere Versuche an zwei Substanzen vorzunehmen, die zwar nicht selbst Kohlenhydrate sind, von denen aber des öfteren ein mehr oder weniger enger Zusammenhang mit den Zuckerarten vermutet wurde.

Die eine dieser Substanzen ist das Glycerin, das einerseits nach den Untersuchungen Lüthjes[1]) im Tierkörper mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit Zucker zu bilden vermag, und das andererseits vielleicht auch im Tierkörper, der sicher einer Neubildung von Glycerin fähig ist, aus Kohlenhydraten entstehen dürfte.

Die andere Substanz, von der man ebenfalls des öfteren einen genetischen Zusammenhang mit Kohlenhydraten angenommen hat, ist der Inosit[2]). Vom Inosit speziell hat Paul Mayer[3]) auf Grund von an Kaninchen angestellten Versuchen einen Übergang in Milchsäure behauptet. Er konnte nämlich feststellen, daß bei Kaninchen nach subcutaner Injektion großer Inositmengen Ausscheidung nicht unerheblicher Mengen von Milchsäure, und zwar von Gärungsmilchsäure, durch den Harn auftrat.

---

[1]) H. Lüthje, Die Zuckerbildung aus Glycerin. Arch. f. klin. Med. **80**, 98, 1904.

[2]) Das Präparat wurde uns von der Gesellschaft für chemische Industrie in Basel in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt.

[3]) Paul Mayer, Über das physiologische Verhalten von Inosit. Diese Zeitschr. **9**, 533, 1908.

Tabelle IV.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A gewonnene Menge Zinklactat g	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B gewonnene Menge Zinklactat g	Aus d. Wägung d. Zinksalzes berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Aus der titrierten Aldehydmenge berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Durch Titration erhaltene Milchsäuremenge in Prozenten der durch Wägung erhaltenen in		Zu- oder Abnahme der Milchsäure nach der Durchblutung		Aus 1200 ccm Filtrat der durchbluteten Leber gewonnene Milchsäuremenge g
					Blut A g	Blut B g	Blut A g	Blut B g	Blut A %	Blut B %	a) pro 1000 ccm Blut g	b) in % des Ausgangswertes	
11	180	24 g Glycerin	0,078 0,080	0,138 0,149	0,289 0,296	0,511 0,552	0,219 0,222	0,402 0,438	76 75	79 79	+ 0,200	+ 90	—
12	157	25 g Glycerin	0,078 0,075	0,174 0,168	0,289 0,278	0,644 0,622	0,202 0,203	0,458 0,445	70 73	71 71	+ 0,249	+ 122	0,093
13	232	15 g Glycerin	0,088 0,083	0,220 0,257	0,326 0,307	0,815 0,952	— 0,210	0,542 —	— 69	66 —	+ 0,332	+ 158	0,199
14	—	15 g Glycerin	0,119 0,100	0,349 0,341	0,441 0,370	1,292 1,263	Im Mittel 0,279	Im Mittel 0,828	71	65	+ 0,549	+ 197	0,236
15	255	17 g Glycerin	0,118 0,123	0,274 0,310	0,436 0,455	1,015 1,148	0,279 0,275	0,633 0,553	64 60	62 48	+ 0,316	+ 114	0,260
16	154	11,3 g Glycerin	0,148 0,162	0,208 0,217	0,548 0,600	0,770 0,804	0,273 —	0,528 —	50 —	68 —	+ 0,255	+ 94	—

In den 6 Versuchen (Versuch 11 bis 16 der Tabelle IV) wurde die Durchströmung mit Glycerin vorgenommen. In allen diesen Versuchen fand, wie wiederum aus der Kolonne 4 und 5, sowie aus den Kolonnen 8 und 9 ersichtlich ist, eine ganz erhebliche Milchsäurebildung statt.

Die prozentische Zunahme schwankte zwischen 90 % in Versuch 11 und 197 % in Versuch 14, sie ist also nicht ganz so bedeutend, wie in den Lävuloseversuchen. Auch aus dem Durchblutungsblut dieser Versuche habe ich reines Zinklactat durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus heißem Wasser dar gestellt, und auch hier konnte ich mich durch polarimetrische Untersuchung überzeugen, daß die gebildete Milchsäure offenbar reine Paramilchsäure war.

0,3055 g des wasserfreien Zinklactats wurden in destilliertem Wasser gelöst.

Gewicht der Lösung . . . . . . = 11,5475 g
Spezifisches Gewicht *d* . . . . . = 1,015 bei 18°.
Die Flüssigkeit wurde im 2 dcm-
Rohr polarisiert . . . . . α = — 0,32°
Daraus berechnete Größe für $[\alpha]_D$
bei 30° . . . . = — 5,958°.

Die Tatsache, daß das Glycerin ein starker Milchsäurebildner ist, erscheint deswegen von besonderem Interesse, weil dadurch die Vermutung nahegelegt wird, daß das Glycerin, das, wie ich eben erwähnte, fraglos im Tierkörper neugebildet werden kann, oder dem Glycerin sehr nahestehende Körper beim Abbau der Kohlenhydrate zu Milchsäure als intermediäres Produkt entstehen könnten. Doch werden zur Entscheidung der eben angedeuteten Frage weitere Versuche notwendig sein. (Siehe eine nachstehende Arbeit von Embden, Baldes und Schmitz.)

Tabelle V, Versuch 17 bis 19 gibt über meine Inositversuche Aufschluß. In keinem dieser Fälle kam es zu einer merklichen Vermehrung der Milchsäure im Blute, wie aus den Kolonnen 4 und 5 hervorgeht. Die Vermehrung in Versuch 19 (rechnerisch 3 %) hält sich durchaus innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung. In Versuch 18 ist eine deutliche Verminderung (um 31 %) eingetreten, während in Versuch 17

die Milchsäuremengen im Blut A und Blut B nahezu gleich geblieben sind.

Das Ergebnis meiner Inositversuche steht in scheinbarem Widerspruch mit den obenerwähnten Versuchsergebnissen Paul Mayers, der freilich an Kaninchen arbeitete.

Es ist aber daran zu denken, daß eine ev. vorhandene schwache Milchsäurebildung durch die fraglos neben der Milchsäurebildung einhergehende Milchsäurezerstörung verdeckt wird. Dies Verschwinden von Milchsäure wird ja in Leerversuchen an der glykogenfreien Leber manchmal direkt beobachtet. Ein solches Verschwinden muß aber auch für diejenigen Fälle angenommen werden, in denen es in den schließlich erhaltenen Milchsäurezahlen nicht zum Ausdruck gelangt. Denn, wie aus der bereits obenerwähnten Arbeit von H. Fries hervorgeht und wie in zahlreichen noch unveröffentlichten

Tabelle V.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Nr. des Versuchs	Gewicht d. Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut A gewonnene Zinklactatmenge g	Aus 1200 ccm Filtrat von Blut B gewonnene Zinklactatmenge g	Aus d. Wägung d. Zinksalzes berechnete Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Aus d. titrierten Aldehydmenge ber. Menge Milchsäure pro 1000 ccm Blut		Durch Titration erhaltene Milchsäuremenge in Prozenten der durch Wägung erhaltenen in		Zu- oder Abnahme d. Milchsäure nach der Durchblutung		Aus 1200 ccm Filtrat d. durchbluteten Leber gewonnene Milchsäuremenge g	Bemerkungen
					Blut A g	Blut B g	Blut A g	Blut B g	Blut A %	Blut B %	a) pro 1000 ccm Blut g	b) in % des Ausgangswertes		
17	220	15 g Inosit	0,122 0,127	0,120 0,139	0,452 0,470	0,445 0,515	0,318 —	0,300 —	70 —	67 —	—0,018	—6	0,083	
18	178	20 g Inosit	0,180 0,157	0,119 0,112	0,666 0,581	0,441 0,415	—	—	—	—	[—0,197]	[—31]	0,074	Nur Wägung, daher Zu- resp. Abnahme nach Wägungsresultaten berechnet
19	—	12 g Inosit	0,101	0,105 0,104	0,374	0,389 0,385	—	—	—	—	[+0,011]	[+3]	—	

Untersuchungen weiter festgestellt wurde, tritt beim kurzdauernden Stehen von Blut bei Körpertemperatur regelmäßig eine Vermehrung der Milchsäure ein.

Diese Vermehrung der Blutmilchsäure wird bei Durchströmungsversuchen der glykogenfreien Leber ohne Zusatz durch das bei dieser Versuchsanordnung eintretende Verschwinden von Milchsäure kompensiert oder überkompensiert. Vielleicht bildete auch in meinen Versuchen, ähnlich wie in denen Paul Mayers, der dem Durchströmungsblute zugefügte Inosit Milchsäure, aber nur in so geringem Grade, daß die Milchsäurebildung, ähnlich wie in den Versuchen ohne Zusatz, durch die Milchsäurezerstörung verdeckt wurde.

Aus den hier mitgeteilten Ergebnissen geht hervor, daß bei der Durchströmung der glykogenfreien oder sehr glykogenarmen Leber Lävulose in außerordentlich hohem Maße d-Milchsäure zu bilden vermag. Offenbar ist diese Substanz auch in der isolierten Leber leichter für den direkten Abbau angreifbar als der Traubenzucker.

Auch das Glycerin erwies sich unter den gleichen Versuchsbedingungen als ein starker Bildner von d-Milchsäure, während Milchsäurebildung aus Arabinose und Inosit nicht beobachtet wurde.

Über Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

I. Mitteilung.

Von

G. Embden, Fr. Kalberlah und **H. Engel.**

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In mehreren voranstehenden Arbeiten wurde gezeigt, daß Kohlenhydrate in der künstlich durchbluteten Leber unter Milchsäurebildung abgebaut werden. Wir gelangten auf Grund unserer Versuche zu dem Ergebnis, daß Milchsäure ein auf dem Hauptwege des Kohlenhydratabbaues im Tierkörper gelegenes intermediäres Produkt ist.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß auch verschiedene Nichtkohlenhydrate, nämlich d-l-Alanin und Glycerin von der Leber in Milchsäure umgewandelt werden, während der Fünfkohlenstoffzucker Arabinose und ferner auch Inosit nicht auf den Umfang der Milchsäurebildung in der Leber einwirken.

Was nun insbesondere die Milchsäurebildung aus Kohlenhydrat betrifft, so lag es nunmehr nahe, zu untersuchen, ob sich Milchsäurebildung nicht auch erreichen ließe ohne Zutun lebender Zellen durch Einwirkung von glykolytischem Ferment, dessen Existenz in löslicher Form so oft auch für den tierischen Organismus behauptet wurde.

Die bisherigen glykolytischen Versuche, soweit sie an Organpreßsäften und auch an Organbrei angestellt wurden, haben sich entweder mit den bei dem Verschwinden des Traubenzuckers auftretenden Produkten gar nicht befaßt, oder waren so schweren Einwänden, namentlich auch in bezug auf bakterielle Verunreinigung ausgesetzt, daß ihnen nicht ohne weiteres Beweiskraft zuerkannt werden darf.

Wir stellten uns dementsprechend die Aufgabe, zu untersuchen, ob bei ganz kurzem Stehen möglichst steril gewonnenen Organpreßsaftes eine Milchsäurebildung auftritt und, wenn das der Fall ist, ob ein Zusammenhang dieser Milchsäurebildung mit dem Abbau von Kohlenhydrat erwiesen werden kann[1]).

Unsere ersten Versuche stellten wir mit Leberpreßsaft an, der unter Anwendung der Kosselschen Schneidemaschine gewonnen wurde. Wir nahmen mit einem Teil des Leberpreßsaftes sofort eine Milchsäurebestimmung vor, einen anderen Teil ließen wir kurze Zeit, 60 bis 120 Minuten, mit oder ohne Zusatz von Traubenzucker stehen und bestimmten alsdann die Milchsäure in der von Embden und Kraus geschilderten Weise.

Wir können über diese Leberpreßsaftversuche ganz kurz hinweggehen, denn es gelang uns in keinem Falle, Bildung von Milchsäure im Leberpreßsaft nach kurzdauerndem Stehen bei Körpertemperatur zu erweisen.

Die seit langem bekannte Tatsache, daß in der Muskulatur mit besonderer Leichtigkeit Milchsäure gebildet wird (über den Ursprung der vom Muskel gebildeten Milchsäure weichen die Anschauungen der einzelnen Autoren außerordentlich stark voneinander ab), veranlaßte uns, weitere Untersuchungen am Muskelpreßsaft vorzunehmen.

Wir wollen gleich hier bemerken, daß wir in der Tat eine zum Teil sehr erhebliche Vermehrung der Milchsäure im Muskelpreßsaft nach 1 bis 2 stündigem Stehen des letzteren bei 40° beobachten konnten.

Einen Zusammenhang dieser Milchsäurebildung mit dem Abbau von Kohlenhydrat konnten wir nicht feststellen, im Gegenteil, wie wir glauben, mit Sicherheit ausschließen.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen wie wir gelangte kürzlich W. M. Fletcher, der freilich nicht an Muskelpreßsaft, sondern vorwiegend am lebensfrischen zerkleinerten Muskel von Kaninchen arbeitete[2]), um

---

[1]) Embden hat das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Untersuchung bereits auf dem XXVI. Kongreß für innere Medizin, Wiesbaden 1909, kurz erwähnt.

[2]) W. M. Fletcher, On the alleged formation of lactic acid in muscle during autolysis in postvival periods. The Journal of Physiology **43**, 286, 1911.

weitere Aufschlüsse über die von ihm gemeinschaftlich mit Hopkins[1]) näher untersuchte Milchsäurebildung in überlebenden Froschmuskeln zu gewinnen. Die kurze Mitteilung Embdens auf dem Kongreß für innere Medizin 1909 ist offenbar Herrn Fletcher unbekannt geblieben.

Methodisches.

Wir stellten unsere Versuche bisher ausschließlich an der Muskulatur von Hunden an, die nach verschiedenartiger Fütterung in leichter Äthernarkose durch Entbluten aus beiden Femoralarterien getötet wurden.

In unseren ersten Versuchen brachten wir die mit möglichster Beschleunigung abpräparierte und mit der Fleischhackmaschine zerkleinerte Beinmuskulatur zum Gefrieren, um am nächsten Morgen die Zerkleinerung mit der Kosselschen Schneidemaschine vorzunehmen. Aus dem zerschnittenen Material wurde unter Anwendung von Quarzsand und Kieselgur und unter Benützung der Organsaftpresse von Hans Meyer mittels der Buchnerschen Presse ein Preßsaft gewonnen. In allen späteren Versuchen sahen wir von der Anwendung der Kosselschen Maschine ab und gewannen den Preßsaft sofort nach der Zerkleinerung der Muskulatur mit der Fleischhackmaschine. Die Auspressung erfolgte bis zu einem Druck von 400 Atmosphären. Der abfließende Preßsaft wurde in einem eisgekühlten Maßzylinder gesammelt und nach Beendigung der Pressung gemessen. Ein Teil des Preßsaftes wurde sofort mit Salzsäure und Quecksilberchlorid nach dem Prinzip von Schenck gefällt, wobei bei dem geringen Eiweißgehalt des Muskelpreßsaftes nur wenig Salzsäure und Sublimat zur Enteiweißung nötig war. Der sofort gefällte Muskelpreßsaft A blieb über Nacht im Eisschrank stehen.

Ein oder mehrere der sofort gefällten Menge gleiche Anteile wurden in hermetisch verschließbaren Pulverflaschen oder in Waschflaschen mit Glasschliff während 60 bis 180 Minuten bei 40° gehalten. Diesen Preßsaftportionen wurde eine geringe Menge gesättigter Natriumbicarbonatlösung hinzugefügt, im allgemeinen etwa 2,5 ccm auf 100 ccm Preßsaft. Der Preßsaft

[1]) W. M. Fletcher and Hopkins, F. Gowland. Lactic acid in amphibian muscle. Ebenda **35**, 247, 1907.

reagierte nach diesem Zusatz gegen rotes Lackmuspapier stets schwach, aber deutlich alkalisch.

Nach dem Aufenthalte im Wasserbade von 40° wurde der Preßsaft (Preßsaft B, C usw.) genau in der gleichen Weise wie Preßsaft A gefällt.

Wir wollen hier noch erwähnen, daß alle Manipulationen so aseptisch wie möglich vorgenommen wurden. Sämtliche Gerätschaften, mit denen die Muskulatur und der Preßsaft in Berührung kamen, waren sorgfältig sterilisiert, in allen späteren Versuchen auch Kieselgur und Quarzsand. Ebenfalls nicht ohne Bedeutung war es wohl, daß wir für möglichst rasche Abkühlung des Muskelfleisches sorgten. Namentlich waren die Fleischhackmaschine, die Reibschalen, in denen die Behandlung des Muskelbreies mit Kieselgur und Quarzsand erfolgte, die Meyersche Organsaftpresse nach dem Sterilisieren im Eisschrank auf ca. + 3° bis 6° gekühlt.

Bezüglich der Technik der Milchsäurebestimmung im Muskelpreßsaft können wir uns ganz auf die von Embden und Kraus und von Siegfried Oppenheimer in den voranstehenden Arbeiten gemachten Angaben beziehen. Nur sei erwähnt, daß bei dem geringen Volumen der nach der Entquecksilberung mit Schwefelwasserstoff erhaltenen Filtrate die letzteren ohne weitere Einengung der Ätherextraktion unterworfen werden konnten.

Gleiche, möglichst große Anteile der Filtrate von A, B usw. wurden mit Natronlauge neutralisiert, mit 15 ccm Phosphorsäure von etwa 50 bis 60 $^{c}/_{0}$ wieder angesäuert und erschöpfend im Ätherextraktionsapparat nach Kutscher-Steudel, in allen neueren Versuchen in dem nach Lind extrahiert. Von der Vollständigkeit der Extraktion überzeugten wir uns wenigstens in allen späteren Versuchen durch eine langdauernde Kontrollextraktion, die fast stets entweder nur geringfügige Spuren oder überhaupt gar keine Milchsäure lieferte.

Fast sämtliche Versuchsergebnisse dieser Arbeit sind nur durch Wägung des schließlich gewonnenen Zinksalzes erhalten worden. Nur im letzten Versuch wurde das gewogene Zinksalz noch dem Verfahren von v. Fürth und Charnaß unterworfen, das aber in einer großen Zahl von Versuchen der nachfolgenden Arbeit von Kura Kondo zur Anwendung kam.

Versuchsergebnisse.

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in der untenstehenden Tabelle zusammengestellt. Aus Kolonne 2 dieser Tabelle geht die Fütterung des Hundes und die Menge des beim Pressen der Muskulatur gewonnenen Saftes hervor. Die Kolonnen 3 bis 5 geben den nötigen Aufschluß über die Behandlung des sofort verarbeiteten Preßsaftes A und die an ihm gewonnenen Ergebnisse. Die Kolonne 3 gibt die Menge des für die Bestimmung A verwendeten Preßsaftes und die genaue Ausführung der Fällung an. Aus Kolonne 4 ist ersichtlich, wieviel Kubikzentimeter des entquecksilberten Preßsaftfiltrats zur Ätherextraktion gelangten. Die Kolonnen 3 und 4 gelten auch für die Bestimmungen B, C usw., denn überall wurde hier dieselbe Preßsaftmenge wie für A benutzt und die Fällung geschah in ganz der gleichen Weise. Kolonne 5 gibt die Menge gewogenen, wasserfreien (bei 105 bis 110° zur Gewichtskonstanz getrockneten) Zinksalzes aus A an. Die entsprechenden Werte für B finden sich in Kolonne 8. Aus der Kolonne 6 geht hervor, wieviel Kubikzentimeter gesättigter Natriumbicarbonatlösung den zum Stehen bei 40° bestimmten Preßsaftportionen zugesetzt wurde. Kolonne 7 gibt an, wie lange der Aufenthalt dieser Preßsaftportionen bei 40° dauerte. Auch findet sich hier ein Vermerk, ob während des Aufenthaltes bei 40° Sauerstoffdurchleitung erfolgte. In den Kolonnen 18 und 19 ist zum besseren Vergleich der verschiedenen Versuche untereinander die aus Preßsaft A und B gefundene Menge Zinklactat auf je 100 ccm Preßsaft umgerechnet, während Kolonne 23 die Zunahme an Zinklactat in 100 ccm Preßsaft B während des Stehens bei 40° angibt.

Fassen wir zunächst die Kolonnen 5 und 8 ins Auge, aus denen die Mengen Zinksalz aus Preßsaft A und B, die unmittelbar miteinander vergleichbar sind, hervorgehen. In allen Fällen wurde aus B mehr Zinksalz gewonnen als aus A. Die Unterschiede sind zum Teil zwar geringe, wie in Versuch 2, wo ein nach mehrtägigem Hungern mit Strychnin vergifteter Hund die Muskulatur lieferte. Teils sind sie aber auch sehr beträchtliche, so in Versuch 3, wo die Menge Zinklactat aus A = 0,1792 g, die aus B = 0,2416 g bzw. in der vollkommen getrennt angesetzten Parallelbestimmung 0,2373 g ist. In Ver-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Preßsaft A (sofort gefällt)			Preßsaft B			Preßsaft C wie B behandelt, doch unter		
Nr. des Versuchs	Fütterung des Hundes Menge des gewonnenen Preßsaftes ccm	Menge des Preßsaftes Art der Fällung des Preßsaftes	Zur Milchsäurebestimmung verwend. Filtratmenge ccm	Gefund. Menge wasserfreien Lactates g	Menge der zugesetzt. Natriumbicarbonatlösung ccm	Dauer des Stehens bei 40°	Gefundene Menge wasserfreies Lactat in g. Zunahme gegen A in g	Zusatz von	Gefund. Menge wasserfreies Zinklactat	Zunahme gegen A
1	Reichlich gefüttert. Hund. Preßsaftmenge 250	80 ccm Preßsaft 50 ccm Wasser 60 ccm Salzsäure 60 ccm Sublimatlösg.	170	0,5278	2	60 Min. unter Sauerstoffdurchleitung	B_1 = 0,5956 B_2 = 0,5898 In B mehr gefundene Lactatmenge: 0,0649			
2	Magerer mit Strychninvergifteter Hund, stirbt 1 Stde. n. Beginn der Strychninvergiftung. Menge des Preßsaftes 170	75 ccm Preßsaft 75 ccm Wasser 85 ccm Salzsäure 85 ccm Sublimatlösg.	150	0,3038	2	90 Min. unter Sauerstoffdurchleitung	0,3232 In B mehr gefundene Lactatmenge 0,0194			
3	Gefütterter Hund. Menge des Preßsaftes 140	45 ccm Preßsaft 40 ccm Wasser 40 ccm Salzsäure 40 ccm Sublimatlösg.	120	0,1792	0,5	do.	B_1 = 0,2416 B_2 = 0,2373 In B mehr gefundene Lactatmenge 0,0603			
4	Frisch angekommener Hund (hat einige Zeit gehungert). Menge des Preßsaftes 123	60 ccm Preßsaft 40 ccm Wasser 40 ccm Salzsäure 60 ccm Sublimatlösg.	135	0,2980		60 Min. ohne Sauerstoffdurchleitung	0,3487 In B mehr gefundene Lactatmenge 0,0507			
5	Mehrere Tage mit Traubenzucker gefütterter Hund. Menge des Preßsaftes 220	70 ccm Preßsaft 50 ccm Wasser 50 ccm Salzsäure 70 ccm Sublimatlösg.	160	0,2917	1,0	60 Min. unter Sauerstoffdurchleitung	B_1 = 0,3817 B_2 = 0,4015 In B mehr gefundene Zinklactatmenge 0,0999			

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Preßsaft D wie B behandelt, doch unter			Preßsaft E wie B behand., doch unt.			Für 100 ccm Preßsaft berechn. Menge Zinklactat in g					Zunahme des Zinklactates in 100 ccm Preßsaft B	Bemerkungen
Zusatz von	Gefundene Menge wasserfr. Zinklactat	Zunahme gegen A	Zusatz von	Gefundene Menge wasserfr. Zinklactat	Zunahme gegen A	A	B	C	D	E		
						0,970	B_1 1,095 B_2 1,084				0,12	Das Fleisch wurd. mit der Kosselschen Schneidemaschine geschnitten
						0,864	0,919				0,055	Das Fleisch wurd. mit der Kosselschen Schneidemaschine zerkleinert. Der Preßsaft A enthält nur Spuren reduzierender Substanz
						0,548	B_1 0,739 B_2 0,726				0,185	
						0,811	0,948				0,137	Angabe über die Menge zugesetzt. Natriumbicarbonatlösung fehlt
						0,624	B_1 0,817 B_2 0,859				0,214	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Preßsaft A (sofort gefällt)			Preßsaft B			Preßsaft C wie B behandelt, doch unter		
Nr. des Versuchs	Fütterung des Hundes Menge des gewonnenen Preßsaftes ccm	Menge des Preßsaftes Art der Fällung des Preßsaftes	Zur Milchsäurebestimmung verwend. Filtratmenge ccm	Gefund. Menge wasserfreien Lactates g	Menge der zugesetzt. Natriumbicarbonatlösung ccm	Dauer des Stehens bei 40°	Gefundene Menge wasserfreies Lactat in g. Zunahme gegen A in g	Zusatz von	Gefund. Menge wasserfreies Zinklactat	Zunahme gegen A
6	Gewöhnliche Fütterung. Menge des Preßsaftes 200	60 ccm Preßsaft 50 ccm Wasser 50 ccm Salzsäure 80 ccm Sublimatlösg.	170	0,3007	1,0	60 Min. unter Sauerstoffdurchleitung	B_1 = 0,3554 B_2 = 0,3445 In B mehr gefundene Zinklactatmenge 0,0492			
7	Gewöhnliche Fütterung. Menge des Preßsaftes 175	50 ccm Preßsaft 40 ccm Wasser 40 ccm Salzsäure 50 ccm Sublimatlösg.	125	0,1529		60 Min.	B_1 = 0,1824 B_2 = 0,1802 In B mehr gefundene Zinklactatmenge 0,0284			
8	Hund nach 24stündigem Hunger.	30 ccm Preßsaft 30 ccm Wasser 30 ccm Salzsäure 30 ccm Sublimatlösg.	100	0,1162	0,75	60 Min.	B_1 = 0,1572 B_2 = 0,1558 In B mehr gefundene Zinklactatmenge 0,0403			
9	Wohlgenährter Hund. Menge des Preßsaftes 200	40 ccm Preßsaft 40 ccm Wasser 80 ccm Salzsäure 80 ccm Sublimatlösg.	200	0,261	2	3 Std.	0,339 In B mehr gefundene Zinklactatmenge 0,078	20 ccm Traubenzuckerlösung von 10% 2 ccm gesätt. Natr.-bicarbonatlösg.	0,354	0,093
10	Hungerhund m. Strychnin vergiftet. Menge des Preßsaftes 210	40 ccm Preßsaft 20 ccm Kochsalzlösg. 20 ccm Wasser 30 ccm Salzsäure 30 ccm Sublimatlösg.	100	0,278	1 ccm gesätt. Natr.-bicarbonatlösg. 20 ccm Kochsalzlösung	90 Min. unter Sauerstoffdurchleitung	0,342 In B mehr gefundene Zinklactatmenge 0,064	20 ccm Traubenzuckerlösung von 10% 1 ccm Natr.-bicarbonatlösg.	0,329	0,051

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Preßsaft D wie B behandelt, doch unter			Preßsaft E wie B behand., doch unt.			Für 100 ccm Preßsaft berechn. Menge Zinklactat in g					Zunahme des Zinklactates in 100 ccm Preßsaft B	Bemerkungen
Zusatz von	Gefundene Menge wasserfr. Zinklactat	Zunahme gegen A	Zusatz von	Gefundene Menge wasserfr. Zinklactat	Zunahme gegen A	A	B	C	D	E		
						0,707	B_1 0,835 B_2 0,810				0,116	
						0,440	B_1 0,525 B_2 0,519				0,082	Keine Angabe über Natriumbicarbonatzusatz
						0,465	B_1 0,629 B_2 0,623				0,161	
Wie bei B, nur statt der Kochsalzlösg. 20 ccm Glykogenlösung von 10%	0,350	0,089	Wie bei B, nur zu der Kochsalzlösung 1 g Inosit	0,347	0,086	0,783	1,017	1,062	1,050	1,041	0,234	
20 ccm Glykogenlösung von 10% 1 ccm Natr.-bicarbonatlösg.	0,330	0,052	1 g d-l-Alanin in 20 ccm Kochsalzlösung 1 ccm Natr.-bicarbonatlösung	0,329	0,051	0,973	1,197	1,141	1,155	1,141	0,224	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Preßsaft A (sofort gefällt)			Preßsaft B			Preßsaft C wie B behandelt, doch unter		
Nr. des Versuchs	Fütterung des Hundes Menge des gewonnenen Preßsaftes ccm	Menge des Preßsaftes Art der Fällung des Preßsaftes	Zur Milchsäurebestimmung verwend. Filtratmenge ccm	Gefund. Menge wasserfreien Lactates g	Menge der zugesetzt. Natriumbicarbonatlösung ccm	Dauer des Stehens bei 40°	Gefundene Menge wasserfreies Lactat in g. Zunahme gegen A in g	Zusatz von	Gefundene Menge wasserfreies Zinklactat	Zunahme gegen A
11	Normalernährter Hund. Menge des Preßsaftes 180	40 ccm Preßsaft 10 ccm Kochsalzlösg. 40 ccm Wasser 30 ccm Salzsäure 40 ccm Sublimatlösg.	110	0,1003	10 ccm Kochsalzlösung 1 ccm Natr.-bicarbonatlösung	60 Min. ohne Sauerstoffdurchleitung	0,2209 In B mehr gefunden als in A 0,1206	10 ccm Kochsalzlösg. + 0,1 g Traub.-zucker. 1 ccm gesätt. Natr.-bicarbonatlösg.	0,2195	0,1192
12	Normalernährter Hund. Menge des Preßsaftes 155	40 ccm Preßsaft 40 ccm Wasser 40 ccm Salzsäure 40 ccm Sublimatlösg.	140	0,1474 [0,1215]	10 ccm Kochsalzlösung 1 ccm Natr.-bicarbonatlösung	do.	0,1839 [0,158]	10 ccm einer Inositlösung von 2,5 % in physiolog. Kochsalzlösg.	0,1994 [0,165]	

such 5 wurden aus Bestimmung A etwas über 290 mg, aus den beiden Bestimmungen B durchschnittlich 390 mg Zinksalz gewonnen, in Versuch 11 aus Bestimmung A 100 mg, aus Bestimmung B 220 mg. In diesem Versuch ist die Zunahme nicht nur absolut, sondern auch prozentisch am größten. In Versuch 12 wurde das gewogene Zinklactat nach der Methode von v. Fürth und Charnaß in der im hiesigen Institut üblichen Weise weiter behandelt. Die eingeklammerten Zahlen in den Kolonnen 5 und 8 geben hier den titrimetrisch ermittelten Wert an, der sowohl bei A als bei B merklich geringer als der gravimetrisch gewonnene ist, aber im Prinzip zu demselben Ergebnis führt.

Wenden wir uns nun zu den in den Kolonnen 18 und 19 niedergelegten Umrechnungen auf 100 ccm Preßsaft. Wir sehen zunächst, daß der Milchsäuregehalt des sofort verarbeiteten Preßsaftes ein recht verschiedener ist. Die Menge Zink-

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Preßsaft D wie B behandelt, doch unter			Preßsaft E wie B behand., doch unt.			Für 100 ccm Preßsaft berechn. Menge Zinklactat in g					Zunahme des Zinklactates in 100 ccm Preßsaft B	Bemerkungen
Zusatz von	Gefundene Menge wasserfr. Zinklactat	Zunahme gegen A	Zusatz von	Gefundene Menge wasserfr. Zinklactat	Zunahme gegen A	A	B	C	D	E		
10 ccm Kochsalzlösung 0,85 % + 0,1 g Inosit 1 ccm gesätt. Natr.-bicarbonatlösung	0,2131	0,1128				0,365	0,804	0,799	0,776		0,439	
						0,421 [0,347]	0,525 [0,451]	0,570 [0,471]			0,104	

lactat pro 100 ccm Preßsaft schwankt zwischen 0,365 g in Versuch 11, in dem, wie bereits erwähnt, die stärkste Michsäurezunahme beim Stehen erfolgte, und annähernd 0,97 g in den Versuchen 1 und 10. Der Lactatgehalt in 100 ccm Preßsaft B schwankt von wenig über 0,5 g in den Versuchen 7 und 12 bis nahezu 1,2 g in Versuch 10.

In mehreren Fällen wurden die Versuche B doppelt ausgeführt. Die Resultate der Doppelbestimmungen stimmen im allgemeinen befriedigend überein (siehe Versuche 1, 3, 5, 6, 7, 8, Kolonne 8), jedenfalls so gut, daß die Zunahme während des Stehens in fast allen Fällen weit außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegt. Was die Natur der auftretenden Milchsäure betrifft, so handelt es sich offenbar ausschließlich um das Auftreten von d-Milchsäure, doch scheinen uns weitere Untersuchungen der optischen Natur in Fällen mit möglichst großer prozentischer Vermehrung der Milchsäure erwünscht.

Daß das gewogene Zinksalz nicht völlig reines Lactat war, geht schon daraus hervor, daß die titrimetrisch ermittelten Werte in Versuch 12 merklich mehr hinter den gewichtsanalytisch gewonnenen zurückbleiben, als es durch den geringen, der v. Fürth-Charnaßschen Methode anhaftenden Fehler bedingt ist. Bei der Zinkbestimmung geben die aus Muskelpreßsaft gewonnenen Zinksalze anscheinend fast stets einen, um ein Geringes zu hohen Zinkgehalt (ZnO-Gehalt des wasserfreien Salzes statt 33,42 % etwa 34,0 bis 34,4 %). Das Zinklactat ist also mit einem zinkreicheren Salze verunreinigt. Daß die Verunreinigung keine sehr erhebliche ist, geht außer aus dem Ergebnis der titrimetrischen Bestimmung in Versuch 12 aus zahlreichen analogen Bestimmungen der auf diese folgenden Arbeit von Kura Kondo hervor.

Welcher Art ist nun die Vorstufe, aus der sich bei kurzdauerndem Stehen des Muskelpreßsaftes Milchsäure bildet?

Wir haben eingangs erwähnt, daß wir zu unseren Versuchen gelangten durch den Wunsch, die an der künstlich durchbluteten Leber beobachtete Milchsäurebildung aus Kohlenhydrat auch unabhängig von lebenden Zellen auf rein fermentativem Wege zu erzielen. Und die in einem Teile der Versuche sehr beträchtliche, in allen aber deutliche Vermehrung der Milchsäure bei kurzdauerndem Stehen des Preßsaftes schien uns zunächst im Sinne eines Kohlenhydratabbaues zu Milchsäure im zellfreien Muskelpreßsaft zu sprechen.

Freilich mußte schon ein Umstand uns von vornherein die Herkunft der Milchsäure aus Kohlenhydrat zweifelhaft erscheinen lassen. In mehreren Fällen nämlich, in denen wir den Preßsaft sofort nach seiner Gewinnung auf Glykogen mittels der abgekürzten Pflügerschen Methode untersuchten, konnten wir Glykogen überhaupt nicht nachweisen. Und ferner lieferte auch die Untersuchung des im Vakuum stark eingeengten, entquecksilberten und neutralisierten Preßsaftfiltrates nur Anhaltspunkte für das Vorhandensein ganz außerordentlich geringer Zuckermengen[1]). Offenbar war das Glykogen bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht mit in den Preßsaft übergegangen.

[1]) Die Zuckermenge war so gering, daß eine Zuckerbestimmung mittels der Knappschen Methode nicht möglich war.

Entscheidender aber als das völlige Fehlen von Glykogen und die nahezu völlige Abwesenheit von Zucker im Muskelpreßsaft sind nun aber eine Reihe weiterer Versuche, in denen wir dem Preßsaft verschiedene, möglicherweise als Quellen der Milchsäure in Betracht kommende Substanzen zufügten.

Wenn wirklich Traubenzucker, Glykogen usw. für die Milchsäurebildung beim Stehen des Preßsaftes verantwortlich zu machen waren, so mußte Zusatz dieser Substanzen zum Preßsaft die Milchsäurebildung im Sinne einer Steigerung beeinflussen.

Dies ist nun aber in der Tat nicht der Fall.

In den Versuchen 9 bis 12 wurden neben den bereits besprochenen Bestimmungen B, in denen außer etwas gesättigter Bicarbonatlösung (eventuell etwas Kochsalzlösung von 0,85 $^0/_0$) ein Zusatz zum Preßsafte nicht erfolgte, noch Bestimmungen C, D und zum Teil auch E ausgeführt. Diese Preßsaftportionen erhielten einen Zusatz von Traubenzucker, Glykogen und d-l-Alanin und Isonit. Die Art und Menge der jeweils zugesetzten Substanzen ist aus den Kolonnen 9, 12 und 15 ohne weiteres ersichtlich.

Es wurde dafür gesorgt, daß das Volumen des Preßsaftes beim Stehen in den einzelnen Portionen jedes Versuches gleich war. Zu dem Zwecke wurde der Preßsaft B mit Kochsalzlösung von 0,85 $^0/_0$ auf das gleiche Volumen wie die Preßsäfte C, D usw. gebracht.

Wir betrachten zur Beurteilung dieser Versuche (Versuche 9 bis 12) die Kolonnen 5, 8, 10, 13 und 16.

Im Versuch 9 wurden aus der verarbeiteten Preßsaftmenge A 261 mg, aus B (ohne Zusatz) 339 mg, aus C (mit 2 g Traubenzucker) 354 mg, aus D (mit 2 g Glykogen) 350 mg, aus E (mit 1 g Inosit) 347 mg Zinklactat gewonnen. In diesem Versuch ist also die im Muskelpreßsaft ohne Zusatz von Kohlenhydrat oder Inosit gebildete Milchsäuremenge in der Tat um ein ganz weniges geringer als in den Versuchen mit Zusatz, doch liegt der Unterschied innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung. Daß ihm keinerlei wesentliche Bedeutung zukommt, geht ohne weiteres aus dem nachfolgenden Versuch 10 hervor, wo aus dem Preßsaft A 278 mg, aus B (ohne Zusatz) 342 mg und aus C (Traubenzucker), D (Glykogen) und E

(d-l-Alanin) übereinstimmend 329 bis 330 mg Zinklactat gewonnen wurden.

Ganz in demselben Sinne sprechen auch die beiden folgenden Versuche. In Versuch 11 wurden in B (ohne Zusatz), C (mit 0,1 g Traubenzucker), D (mit 0,1 g Inosit) praktisch übereinstimmende Werte gefunden. Gerade in diesen Versuchen war, wie bereits oben erwähnt, die Milchsäurebildung prozentisch und absolut eine ganz besonders starke. Auch die Unterschiede in der Milchsäurebildung in Versuch 12 B (kein Zusatz) und C (Zusatz von 0,25 g Inosit) liegen innerhalb der Grenze der gelegentlich auch bei Doppelbestimmungen erhaltenen Unterschiede, namentlich wenn man hier die titrimetrisch ermittelten Werte berücksichtigt (Zinklactat aus B: 158 mg, Zinklactat aus C: 165 mg).

Wir gelangen also zu dem Schluß, daß die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft nicht erfolgt auf Kosten von Traubenzucker, Glykogen, Inosit oder d-l-Alanin.

So gesichert uns dieses negative Ergebnis erscheint, so wenig können wir auf Grund unserer Versuche über die Natur der milchsäurebildenden Substanz im Muskelpreßsaft aussagen. Es handelt sich offenbar, wie Embden bereits früher hervorgehoben hat[1]), um eine besondere Milchsäurevorstufe, von der man vielleicht vermuten darf, daß sie in Beziehungen zur Siegfriedschen Phosphorfleischsäure steht. Daß die Milchsäurebildung im zerkleinerten Kaninchenmuskel und auch im Froschmuskel durch Zusatz von Kohlenhydrat, sofern nicht bakterielle Verunreinigung hinzutritt, nicht beeinflußt wird, hat auch Fletcher ohne Kenntnis unserer Versuche mit aller Schärfe gezeigt[2]). Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß es sich bei der Milchsäurebildung im zirkulationslosen, zerkleinerten Muskel nicht um die Wirkung eines glykolytischen Fermentes handelt.

Wir möchten noch hervorheben, daß ein merklicher Einfluß der in einem Teil der Versuche erfolgten Sauerstoffdurchleitung beim Stehen des Preßsaftes nicht erkennbar ist.

---

[1]) G. Embden und Fr. Kraus, Beitrag zur Lehre vom Abbau der Kohlenhydrate im Tierkörper. Verhandlungen des 26. Kongresses für innere Medizin. Wiesbaden 1909, S. 354.

[2]) Fletcher, W. M., l. c.

Fletcher und Hopkins haben in ihren bereits erwähnten Untersuchungen dargetan, daß die Froschmuskulatur, wenn sie mit möglichster Schonung behandelt wird, und wenn namentlich auch dafür gesorgt wird, daß die zur Abtötung der Muskulatur benutzten Agenzien keine Milchsäurebildung hervorrufen, nur außerordentlich geringe Mengen Milchsäure enthält, daß hingegen bei Sauerstoffmangel, bei Tätigkeit des Muskels und unter verschiedenen anderen Umständen eine außerordentlich starke Vermehrung der Muskelmilchsäure eintritt. Sowohl in der Froschmuskulatur wie auch nach den neueren Untersuchungen Fletchers (l. c.) in Kaninchenmuskeln tritt Milchsäurebildung durch die mechanische Reizung der zerkleinerten Muskulatur, namentlich wenn dieselbe ohne Kühlung erfolgt, in reichlichem Maße und besonders bei der Kaninchenmuskulatur in kurzer Zeit ein. Wir müssen daher annehmen, daß ein großer Teil der von uns im sofort verarbeiteten Preßsaft gefundenen Milchsäure während der zur Herstellung des Preßsaftes nötigen Manipulationen gebildet wurde.

Die Milchsäurebildung im Muskel ist nach einer namentlich von Salkowski[1]) frühzeitig ausgesprochenen Anschauung eine wesentliche Lebenserscheinung des Muskels, und der Muskel bildet Milchsäure nicht, weil er stirbt, sondern weil er lebt und so lange er lebt. Und Fletcher gelangt zu ganz ähnlichen Anschauungen.

Daß die Milchsäurebildung nicht an die Muskelzellen im Sinne ihrer morphologischen Intaktheit gebunden ist, geht mit aller Schärfe aus unseren Versuchen mit zellfreiem Muskelpreßsaft hervor. Damit ist natürlich nicht gesagt, daß die von uns beobachtete Milchsäurebildung nicht auch für den lebenden Muskel von hervorragender Bedeutung ist.

Wir wollen an dieser Stelle in weitere Erörterungen über die Rolle der Milchsäurebildung bei der Muskeltätigkeit nicht eintreten. Nur einen Punkt möchten wir noch näher ins Auge fassen. In mehreren voranstehenden Arbeiten ist dargetan, daß die Leber aus Kohlenhydraten Milchsäure zu bilden vermag und in einigen nachfolgenden Untersuchungen hoffen wir den strengen Beweis zu führen, daß auch die Formelemente des

---

[1]) E. Salkowski, Zeitschr. f. klin. Med. 17 (Suppl.-Bd.), 77, 1890.

Blutes Zucker unter Milchsäurebildung abbauen. Freilich scheint der Abbau der Kohlenhydrate zu Milchsäure in weitgehendem Maße gebunden zu sein an die Intaktheit der cellulären Tätigkeit.

Die Milchsäurebildung, die wir im Muskelpreßsaft und die Fletcher an der zerkleinerten Kaninchenmuskulatur beobachtete, erfolgt fraglos nicht unter Spaltung der bekannten Kohlenhydrate, aber darum erscheint es uns doch nicht ausgeschlossen, sondern sogar höchst wahrscheinlich, daß während des Lebens bei erhaltener Zirkulation auch die Muskulatur Kohlenhydrate zu Milchsäure abbauen kann. So möchten wir glauben, daß in den Versuchen, die Johannes Müller[1]) am künstlich mit zuckerhaltiger Ringerlösung durchströmten Katzenherzen vornahm, die beobachtete Milchsäurebildung wenigstens teilweise auf direkte Spaltung von Traubenzucker zurückzuführen war, wenngleich in diesen Versuchen wegen der großen Menge auch im Herzmuskel vorhandener „Milchsäurevorstufe" ein strenger Beweis für die Herkunft der Milchsäure aus Kohlenhydraten nicht erblickt werden kann.

(Daß auch die Herzmuskulatur sehr erhebliche Mengen Milchsäurevorstufe enthält, geht aus noch unveröffentlichten Versuchen von Herrn Kura Kondo hervor.)

Verschiedene Anzeichen, so die früher von uns festgestellte Tatsache, daß der unter Acetessigsäure erfolgende Abbau von Fettsäuren allem Anschein nach ausschließlich in der Leber vor sich geht, sowie auch namentlich die von Porges und von Porges und Salomon[2]) angestellten Leberausschaltungsversuche, in denen nach der Leberausschaltung der respiratorische Quotient dem bei reiner Kohlenhydratverbrennung auftretenden entsprach, sprechen dafür, daß alle Organe außer der Leber ihren Energiebedarf ausschließlich durch Kohlenhydratverbrauch decken, und wir halten es auf Grund unserer Versuche an der künstlich durchbluteten Leber und an den Blutzellen für ausgemacht, daß der Hauptweg des Kohlenhydratabbaues im Tierkörper überhaupt über Milchsäure geht.

---

[1]) J. Müller, Über Milchsäurebildung bei der Herztätigkeit, Festschrift für Rosenthal, Seite 343, 1906.

[2]) O. Porges, Über den respiratorischen Quotienten nach Ausschaltung der Abdominalorgane. Diese Zeitschr. 27, 131, 1910. O. Porges und H. Salomon, daselbst 143.

Fletcher und Hopkins haben in ihren schönen Versuchen am Froschmuskel gezeigt, daß die bei der Tätigkeit in der Muskulatur des Froschschenkels gebildete Milchsäure mehr oder weniger vollständig zum Verschwinden gebracht werden kann durch eine Sauerstoffatmosphäre und daß in solchen Muskeln unter geeigneten Versuchsbedingungen die Fähigkeit erneuter Milchsäurebildung quantitativ nicht herabgesetzt ist.

Sollte dieser Befund in dem Sinne zu erklären sein, daß bei Anwesenheit von Sauerstoff die Milchsäure wieder in ihre Vorstufe zurückverwandelt wird, so wäre damit der Beweis erbracht, daß der Muskel fertig gebildete Milchsäure in die Vorstufe verwandeln kann.

Hiermit wäre es in hohem Maße wahrscheinlich, daß die Milchsäure, die vom Muskel zur milchsäurebildenden Substanz verarbeitet wird, auch dann letzten Endes in der Hauptmenge ein Abbauprodukt der Kohlenhydrate ist, wenn dieser Abbau der Kohlenhydrate nicht in der Muskulatur selbst erfolgen sollte. Wenn, wie wir durchaus glauben möchten, die Muskeltätigkeit ganz oder im wesentlichen erfolgt auf Kosten von Kohlenhydraten, so ist es vom energetischen Standpunkt aus außerordentlich verständlich, daß sich in der Muskulatur eine Vorstufe der Milchsäure findet, die mit etwa derselben Leichtigkeit in Milchsäure umgewandelt wird, wie Glykogen in Traubenzucker.

Wie bereits mehrfach erwähnt, geht ja offenbar der Hauptweg des Kohlenhydratabbaues im Organismus über Milchsäure, und in der Milchsäure ist noch bei weitem die Hauptmenge chemischer Energie vorhanden, die im Traubenzucker steckt. Die starke Kohlensäureproduktion des tätigen Muskels spricht zudem dafür, daß hier Verbrennungsprozesse bis zu ihrem Ende durchgeführt werden. Gerade die Tatsache, daß der Muskulatur eine überaus leicht in Milchsäure übergehende Milchsäurevorstufe zur Verfügung steht, läßt den Gedanken aufkommen, daß Milchsäure die wesentlichste Quelle der Muskelkraft ist. Keineswegs soll hiermit gesagt werden, daß dieser Substanz bei der Muskeltätigkeit außer der Energielieferung nicht noch andere gleichwertige Funktionen zukommen, wofür eine ganze Reihe Untersuchungsergebnisse zu sprechen scheint.

Wir wollen hier nur daran erinnern, daß ältere und nament-

lich auch neuere Untersuchungen verschiedener Autoren es außerordentlich wahrscheinlich machen, daß eine bestimmt lokalisierte Milchsäureproduktion innerhalb des Muskelgewebes für die Auslösung der Muskelcontraction von außerordentlicher Bedeutung ist. Gerade bei der raschen Produktion von Milchsäure dürfte der Milchsäurevorstufe, die anscheinend nicht saurer Natur, oder doch weniger sauer als Michsäure ist, eine wichtige Rolle zukommen.

Wir möchten vorschlagen, die Milchsäurevorstufe des Muskels, bis es möglich sein wird, sie nach mehr strukturellen Gesichtspunkten zu benennen, als Lactacidogen zu bezeichnen.

Über Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

II. Mitteilung.

Von

Kura Kondo.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In der voranstehenden Arbeit von Embden, Kalberlah und Engel[1]) konnte gezeigt werden, daß in lebensfrisch gewonnenem Muskelpreßsaft bei kurzem Stehen eine unter Umständen sehr erhebliche Vermehrung der Milchsäure auftritt.

Diese Milchsäure wird nicht durch fermentativen Abbau von Traubenzucker oder Glykogen gebildet; ebensowenig sind Inosit und d-l-Alanin als ihre Muttersubstanzen zu betrachten.

Die genannten Autoren nehmen vielmehr das Vorhandensein einer besonders gearteten Milchsäurevorstufe im Muskel an, einer Vorstufe, aus der die Milchsäurebildung mit etwa derselben Leichtigkeit erfolgt wie die Traubenzuckerbildung aus Glykogen, und die sie als Lactacidogen bezeichnen.

Unabhängig von diesen Versuchen gelangte Fletcher[2]) auf Grund seiner Versuche am zerkleinerten Kaninchenmuskel zu der Anschauung, daß die auch hier auftretende Milchsäurebildung nicht erfolgt durch einen glykolytischen Prozeß. Fletcher glaubte, daß diese Milchsäurebildung gebunden sei an das Überleben, an die Erregbarkeit des Muskels.

Die Tatsache der Milchsäurebildung im zellfreien Muskelpreßsaft beweist, daß die Milchsäurevorstufe vom Muskelgewebe

[1]) G. Embden, Fr. Kalberlah und H. Engel, Über Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft. I. Mitteilung. Diese Zeitschr. 45, 45, 1912.

[2]) W. M. Fletcher, On the alleged formation of lactic acid in muscle during autolysis in postvival periods. Journ. of Physiol. 43, 286, 1911.

trennbar ist, daß ihre Umwandlung in Milchsäure unabhängig von der morphologischen Intaktheit der Muskulatur, wahrscheinlich wohl auf fermentativem Wege erfolgen kann.

Es ergibt sich nunmehr die weitere Aufgabe, die milchsäurebildende Substanz des Muskels zu isolieren und Aufschluß zu gewinnen über ihre chemische Struktur.

Die Versuche, die ich auf Veranlassung von Professor Embden ausführte und über die ich im folgenden kurz berichten möchte, führen diese Aufgabe ihrer Lösung vielleicht nicht wesentlich näher, aber sie bereiten ihre Bearbeitung doch insoweit vor, als sie gewisse Eigenschaften der milchsäurebildenden Substanz feststellen, die für die Möglichkeit ihrer Darstellung nicht bedeutungslos sein dürften.

Unabhängig von der Frage der Isolierung der milchsäurebildenden Substanz sind einige meiner Ergebnisse — wie ich glaube — nicht ohne biologische Bedeutung.

Methodisches.

Der Preßsaft wurde in meinen Versuchen ganz in der von Embden, Kalberlah und Engel beschriebenen Weise gewonnen, wobei ich in allen Versuchen von der Anwendung der Kosselschen Schneidmaschine absah.

Auch bezüglich der Milchsäurebestimmungen kann ich auf die Angaben der eben genannten Autoren, sowie auf diejenigen von Embden und Kraus sowie S. Oppenheimer verweisen[1]. Ich will hier nur hervorheben, daß ich in zahlreichen Versuchen nach der Wägung des Zinksalzes noch die Methode von v. Fürth und Charnaß in der im hiesigen Institut üblichen Weise anwendete.

I. Zeitlicher Verlauf der Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

In einer Reihe von Versuchen suchte ich zunächst Aufschluß über den zeitlichen Verlauf der Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft zu gewinnen. Ich hielt hierbei möglichst genau die in der voranstehenden Arbeit geschilderten Versuchsbedin-

[1] Siehe Embden, Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden **5**, 1254, 1912.

gungen inne. Ein Preßsaftanteil wurde sofort verarbeitet, mehrere andere nach verschieden langem Stehen im Wasserbade von 40°. Für jeden Einzelversuch kamen 40 ccm Preßsaft zur Anwendung, denen übereinstimmend 1 ccm gesättigter Natriumbicarbonatlösung zugesetzt wurde. Sauerstoffdurchleitung erfolgte hier ebensowenig wie in irgendeinem anderen meiner Versuche.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Zeitlicher Verlauf der Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Ergebnisse der gravimetr. Methode				Ergebn. d. titrimetr. Meth.				
Nr. des Versuchs	Verarbeitete Menge Preßsaftfiltrat ccm	Gefundene Menge Zinklactat g	Daraus berechn. Milchsäure g	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Gefundene Menge Milchsäure g	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Titrimetrisch ermittelter Wert in Prozenten des gravimetr. gewonnenen	Bemerkungen
1	je 130 4 : 1	A = 0,1660	0,1230	0,3785	—	—	—	—	—	Zu je 40 ccm Preßsaft B u. C je 1 ccm Natriumbicarbonatlösung. Die Bestimmungen B blieben 30 Min., die Bestimmungen C blieben 60 Min. bei 40°.
		B_1 = 0,1987	0,1472	0,4529	**0,0744**	—	—	—	—	
		B_2 = 0,2019	0,1496	0,4603	**0,0818**	—	—	—	—	
		C_1 = 0,1995	0,1478	0,4548	**0,0763**	—	—	—	—	
		C_2 = 0,2014	0,1492	0,4591	**0,0806**	—	—	—	—	
2	je 100 3 : 1	A = 0,1346	0,0997	0,2991	—	—	—	—	—	Zu je 40 ccm Preßsaft B u. C je 1 ccm Natriumbicarbonatlösung.
		B = 0,1463	0,1084	0,3252	**0,0261**	—	—	—	—	
		C_1 = 0,1675	0,1241	0,3723	**0,0732**	—	—	—	—	
		C_2 = 0,1740	0,1289	0,3867	**0,0876**	—	—	—	—	
3	je 100 3 : 1	A = 0,1135	0,0841	0,2523	—	0,0738	0,2214	—	87,8	Zusatz der Natriumbicarbonatlösung wie in Versuch 2.
		B = 0,1413	0,1045	0,3135	**0,0612**	0,0898	0,2694	**0,0480**	85,9	
		C_1 = 0,1350	0,1000	0,3000	**0,0477**	—	—	—	—	
		C_2 = 0,1368	0,1014	0,3042	**0,0519**	0,0835	0,2505	**0,0291**	82,3	
4	je 130 4 : 1	A = 0,1426	0,1057	0,3252	—	0,0904	0,2782	—	85,5	Zusatz der Natriumbicarbonatlösung wie in Versuch 2.
		C = 0,1450	0,1074	0,3305	—	0,0934	0,2874	—	86,9	
		D = 0,1425	0,1056	0,3249	—	0,0904	0,2782	—	85,5	

Aus Kolonne 2 dieser Tabelle ist die Menge des verarbeiteten Preßsaftfiltrates und der Grad seiner Verdünnung ersichtlich.

In Kolonne 3 ist als A der sofort nach Schenck gefällte, als B der nach 30 Minuten, als C der nach 60 Minuten und als D der nach 120 Minuten verarbeitete Preßsaftanteil be-

zeichnet. Diese Kolonne gibt die gewogene Menge wasserfreies Zinklactat an. In Kolonne 4 ist das Ergebnis der Wägung auf Milchsäure umgerechnet. Kolonne 5 gibt die für 100 ccm Preßsaft ermittelte Milchsäuremenge an, während aus Kolonne 6 die während des Stehens erfolgte Milchsäurezunahme in 100 ccm Preßsaft ersichtlich ist.

Betrachten wir die Kolonne 3, so sehen wir, daß in Versuch 1 bereits nach 30 Minuten das Maximum der Milchsäurebildung erreicht ist; die beiden Bestimmungen B stimmen außerordentlich nahe mit den beiden Bestimmungen C überein.

In Versuch 2 ist dagegen die Milchsäurebildung nach einer halben Stunde noch nicht abgeschlossen.

Das Ergebnis des Versuchs 3 stimmt im wesentlichen mit dem des Versuchs 1 überein. Hier sind die für die beiden Bestimmungen C ermittelten Werte sogar etwas geringer als der für B gewonnene, allerdings innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung.

In Versuch 4 wollte ich einen Vergleich der Milchsäurebildung nach 60 und nach 120 Minuten ziehen. Hier erfolgte aber aus unbekannten Gründen überhaupt keine Milchsäurebildung.

Aus den Versuchen der Tabelle I geht jedenfalls hervor, daß die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft des Hundes ein außerordentlich rasch verlaufender Vorgang ist. In zwei von den drei in Betracht kommenden Versuchen ist er nach 30 Minuten abgeschlossen. Dies stimmt sehr gut zu der Feststellung Fletchers[1]), daß in zerkleinerten Kaninchenmuskeln bei Körpertemperatur die Milchsäurebildung in weniger als einer Stunde ihr Maximum erreicht haben kann.

In den Versuchen 3 und 4 wurde das Ergebnis der gravimetrischen Methode durch Anwendung des titrimetrischen Verfahrens auf das gewogene Zinksalz kontrolliert. Die titrimetrisch ermittelten Werte sind hier, wie in allen späteren Versuchen, merklich kleiner als die gravimetrisch gewonnenen. Bei der Anwendung des v. Fürth-Charnaßschen Verfahrens auf reines milchsaures Zink in den hier in Betracht kommenden Mengen

---

[1]) W. M. Fletcher, Lactic acid in muscle. Journ. of Physiol. 43, 286, 1911.

werden mindestens 95 % der theoretischen Menge gefunden, während in den Versuchen 3 und 4 der Tabelle I nur 82,3 % (Versuch 3 C) bis 87,8 % (Versuch 3 A) erhalten wurden. Offenbar ist das milchsaure Zink stets etwas verunreinigt. Demnach sind die gravimetrisch ermittelten Milchsäurewerte ein wenig zu hoch, die titrimetrisch gewonnenen etwas zu niedrig.

Im übrigen liefern die titrimetrischen Bestimmungen in Versuch 3 und 4 durchaus eine Bestätigung der gravimetrisch gewonnenen Ergebnisse.

In Versuch 3 (Kolonne 7) liefert die titrimetrische Bestimmung keinen höheren Wert als die Bestimmung B, im Gegenteil einen etwas geringeren; in Versuch 4 ist titrimetrisch ebensowenig wie gravimetrisch eine Milchsäurebildung beim Stehen des Preßsaftes bemerkbar. Die Verunreinigung des Lactats ist in den drei Bestimmungen dieses Versuches eine überaus ähnliche (Ausbeute an Milchsäure 85,5 bis 86,9 % der theoretischen Menge, Kolonne 10).

II. Einwirkung raschen Erwärmens auf den Milchsäuregehalt des Muskelpreßsaftes.

Für die Gewinnung der Milchsäurevorstufe aus dem Muskelpreßsafte konnte ihr Verhalten beim raschen Erwärmen des Muskelpreßsaftes bis zur Siedehitze von Bedeutung sein.

Ich habe drei derartige Versuche ausgeführt, deren Ergebnisse aus Tabelle II hervorgehen. Die Anordnung dieser Tabelle entspricht ganz derjenigen der Tabelle I.

Auch hier wurden die Einzelversuche an je 40 ccm Preßsaft vorgenommen. Die Versuche A wurden sofort verarbeitet, die Versuche B nach einstündigem Stehen bei 40° unter Zusatz von 1 ccm Natriumbicarbonatlösung. Die Bestimmungen C wurden ohne Zusatz in Erlenmeyerkolben möglichst rasch bis zur Siedehitze erwärmt.

In allen Versuchen der Tabelle II ist nach einstündigem Stehen des Preßsaftes bei 40° übereinstimmend mit den früheren Versuchsergebnissen eine sehr erhebliche Milchsäurebildung eingetreten (Kolonne 3 B). Der erhitzte Anteil (Kolonne 3 C) zeigt in Versuch 5 kaum einen höheren Milchsäuregehalt als der Versuch A (gewogene Lactatmenge 0,2091 g in C gegen 0,1946 g in A).

Tabelle II.
Einwirkung raschen Erwärmens auf den Milchsäuregehalt des Muskelpreßsaftes.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuchs	Verarbeitete Menge Preßsaftfiltrat ccm	Gefundene Menge Zinklactat g	Daraus berechn. Milchsäure g	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Bemerkungen
5	135 4 : 1	A = 0,1946 B_1 = 0,2683 B_2 = 0,2666 C = 0,2091	0,1442 0,1988 0,1976 0,1549	0,4273 0,5890 0,5845 0,4590	— 0,1617 0,1572 0,0317	Zu 40 ccm Preßsaft B_1 und B_2 je 1 ccm Natriumbicarbonatlösung.
6	130 4 : 1	A = 0,1727 B = 0,2135 C = 0,2094	0,1280 0,1582 0,1552	0,3939 0,4868 0,4776	— 0,0929 0,0837	Bicarbonatzusatz wie in Versuch 5.
7	132 4 : 1	A = 0,1988 B = 0,2407 C = 0,2030	0,1473 0,1784 0,1504	0,4463 0,5406 0,4557	— 0,0943 0,0094	Bicarbonatzusatz wie in Versuch 5.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse in Versuch 7, wo ebenfalls die Zunahme der Milchsäure beim Erwärmen zur Siedehitze innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegt, während in Versuch 6 der Milchsäuregehalt von C kaum geringer ist als derjenige von B. Ob in diesem Falle die Erwärmung des Preßsaftanteiles C langsamer erfolgte als in den beiden anderen Versuchen, kann ich nicht angeben.

Einen guten Überblick über das Ergebnis dieser Versuche erhält man aus Kolonne 6, in der die Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft angegeben ist.

In Versuch 5 beträgt diese Zunahme für B 0,162 g, in der Parallelbestimmung 0,157 g; für C erreicht sie nur den Wert von 0,032 g. In Versuch 7 B ist die Milchsäurebildung pro 100 ccm Preßsaft gleich 0,0943 g, während sie in C rechnerisch nur etwa ein Zehntel dieses Wertes beträgt. Hingegen erreicht die Milchsäurezunahme in Versuch 6 C mit 0,0837 g pro 100 ccm fast den für B ermittelten Wert (0,0929 g).

Im ganzen geht aus den Versuchen der Tabelle II jedenfalls hervor, daß beim raschen Erwärmen des Muskelpreßsaftes zur Siedehitze die Milchsäurevorstufe nicht ohne weiteres Milch-

säure abspaltet. Die an sich innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmuug gelegene Milchsäurezunahme in den Versuchen 5C und 7C dürfte ebenso wie die recht beträchtliche Milchsäurebildung in Versuch 6C nicht nach dem Erreichen der Siedetemperatur, sondern beim Passieren niedrigerer Temperaturen erfolgt sein.

Dies würde vollkommen übereinstimmen mit den Erfahrungen von Fletcher und Hopkins an der frischen Muskulatur.

Der nach dem Koagulieren der Muskulatur durch Kochen ermittelte Milchsäuregehalt ist nach diesen Autoren um so geringer, je rascher das Erhitzen der Muskulatur erfolgt.

III. Einwirkung von Säure auf die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

Von erheblichem Interesse erschien die Frage, in welcher Weise die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft durch Änderungen der Acidität bezüglich der Alkalescenz beeinflußt wird.

Tabelle III.

Einwirkung von Säure auf die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Ergebnisse der gravimetr. Methode				Ergebn. d. titrimetr. Meth.				
Nr. des Versuchs	Verarbeitete Menge Preßsaftfiltrat	Gefundene Menge Zinklactat	Daraus berechnete Milchsäure	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Gefundene Menge Milchsäure	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Titrimetrisch ermittelter Wert in Prozenten des gravimetr. gewonnenen	Bemerkungen
	ccm	g	g	g	g	g	g	g		
8	132	A = 0,1292	0,9574	0,2901	—	—	—	—	—	Je 40 ccm B_1 und B_2 mit je 1 ccm Natriumbicarbonatlösg., 40 ccm C mit 4 ccm n-Schwefelsäure versetzt.
	4:1	B_1 = 0,1718	0,1273	0,3857	0,0956	—	—	—	—	
		B_2 = 0,1738	0,1288	0,3903	0,1002	—	—	—	—	
		C = 0,1221	0,9048	0,2742	keine Zunahme	—	—	—	—	
9	100	A = 0,1560	0,1156	0,3468	—	0,0990	0,2970	—	85,6	Je 40 ccm B_1 und B_2 mit je 1 ccm Natriumbicarbonatlösg., 40 ccm C mit 1 ccm n-Schwefelsäure versetzt.
	3:1	B_1 = 0,1876	0,1390	0,4170	0,0702	0,1144	0,3432	0,0462	82,3	
		B_2 = 0,1879	0,1392	0,4176	0,0708	0,1193	0,3579	0,0609	85,7	
		C = 0,1591	0,1179	0,3537	keine Zunahme	0,0964	0,2892	keine Zunahme	81,8	

In Tabelle III sind zwei Versuche wiedergegeben, in denen die Bestimmungen A und B ganz in der oben geschilderten Weise ausgeführt wurden, während in den Bestimmungen C

Zusatz von Normalschwefelsäure erfolgte. In Versuch 8 wurden auf 40 ccm Preßsaft 4 ccm, in Versuch 9 nur 1 ccm n-Schwefelsäure zugesetzt.

Ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß durch einen derartigen Säurezusatz die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft völlig verhindert wird. In den Versuchen 8 und 9 (Tabelle III, Kolonne 3) sind die Milchsäurewerte in den sehr gut übereinstimmenden Parallelbestimmungen B ganz wesentlich größer als in den Bestimmungen A, während die aus den Preßsaftanteilen C gewonnenen Lactatmengen denen aus A praktisch gleich sind. Aus Kolonne 6 ergibt sich die Milchsäurezunahme für 100 ccm Preßsaft B in Versuch 8 zu 95 mg, in einer Parallelbestimmung zu 100 mg, in Versuch 9 beträgt diese Zunahme in zwei Parallelbestimmungen B etwa 70 mg. In Versuch 9 wurde die gravimetrische Methode durch die titrimetrische ergänzt. Im wesentlichen ist das Ergebnis der titrimetrischen Methode das gleiche wie das durch Wägung gewonnene, wenngleich die Parallelbestimmungen B nicht so gut untereinander übereinstimmen.

Für die Bestimmung C wurde in diesem Versuch bei der Wägungsbestimmung eine innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung gelegene Milchsäurezunahme, bei der Titrationsbestimmung eine fast ebenso geringfügige Abnahme des Milchsäuregehaltes festgestellt.

IV. Einwirkung von Natriumbicarbonat auf die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

Nachdem gezeigt wurde, daß Säurezusatz die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft vollkommen aufhebt, mußte es meine Aufgabe sein, nunmehr auch die Einwirkung von Alkali auf den Umfang der Milchsäurebildung zu untersuchen.

In der voranstehenden Arbeit von Embden, Kalberlah und Engel und ebenso auch in der Mehrzahl meiner eigenen Versuche erfolgte der Zusatz geringer Mengen Natriumbicarbonatlösung zum Muskelpreßsaft zur Abstumpfung der dem lebenden Muskel kaum zukommenden sauren Reaktion. Die Bedeutung dieses Zusatzes für die Milchsäurebildung im Preßsaft wurde bisher nicht experimentell festgestellt.

In einer Reihe von Versuchen, die in Tabelle IV zusammengestellt sind, suchte ich über diesen Punkt Aufklärung zu gewinnen.

Tabelle IV.
Einwirkung von Natriumbicarbonat auf die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nr. des Versuchs	Verarbeitete Menge Preßsaftfiltrat	Ergebnisse der gravimetr. Methode				Ergebn. d. titrimetr. Meth.				Bemerkungen
		Gefundene Menge Zinklactat	Daraus berechnete Milchsäure	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Gefundene Menge Milchsäure	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft	Titrimetrisch ermittelter Wert in Prozenten des gravimetr. gewonnenen	
	ccm	g	g	g	g	g	g	g		
10	142	A = 0,2133	0,1579	0,3336	—	0,1204	0,2544	—	76,2	
	3:1	B_1 = 0,3034	0,2248	0,4750	**0,1414**	0,1657	0,3501	**0,0957**	73,7	**Kein Zusatz v. Natriumbicarbonat.**
		B_2 = 0,3025	0,2242	0,4737	**0,1401**	0,1682	0,3554	**0,1010**	75,0	
11	110	A = 0,2149	0,1592	0,4339	—	0,1159	0,3161	—	72,8	
	3:1	B_1 = 0,2235	0,1646	0,4489	**0,0150**	0,1471	0,4011	**0,0850**	89,4	**Kein Zusatz v. Natriumbicarbonat.**
		B_2 = 0,2261	0,1675	0,4568	**0,0229**	0,1543	0,4208	**0,1047**	92,2	**Dasselbe.**
		C = 0,2574	0,1907	0,5200	**0,0861**	0,1594	0,4347	**0,1186**	83,6	**0,5 ccm Natriumbicarbonatlösung auf 45 ccm Preßsaft.**
		D = 0,2558	0,1895	0,5168	**0,0829**	0,1627	0,4437	**0,1276**	85,9	**2,0 ccm Natriumbicarbonatlösung auf 45 ccm Preßsaft.**
12	130	A = 0,1548	0,1147	0,2736	—	0,0867	0,2068	—	75,6	
	3,1:1	B = 0,1720	0,1275	0,3041	**0,0305**	0,1015	0,2421	**0,0353**	79,6	**Zusatz von 5 ccm Kochsalzlösung 0,85 % auf 50 ccm Preßsaft.**
		C = 0,2080	0,1541	0,3675	**0,0939**	0,1245	0,2959	**0,0891**	80,8	**Zusatz von 1 ccm Natriumbicarbonatlösg. u. 4 ccm Kochsalzlösung.**
		D = 0,1786	0,1323	0,3155	**0,0419**	0,1129	0,2693	**0,0625**	85,3	**Zusatz von 2 ccm Bicarbonatlösung u. 3 ccm Kochsalzlösung.**
		F = 0,1635	0,1212	0,2891	**0,0155**	0,1030	0,2457	**0,0389**	85,0	**Zusatz von 2 ccm Natriumbicarbonatlösg. u. 3 ccm Traubenzuckerlösung von 5,4 %.**
13	100	A = 0,1639	0,1208	0,3775	—	0,0988	0,3087	—	81,8	
	3,125:1	B = 0,1868	0,1383	0,4322	**0,0547**	0,1148	0,3588	**0,0501**	83,0	**Zusatz von 5 ccm Kochsalzlösung auf 40 ccm Preßsaft.**
		C = 0,1852	0,1372	0,4288	**0,0513**	0,1174	0,3669	**0,0582**	85,6	**Zusatz von 1 ccm Natriumbicarbonatlösg. u. 4 ccm Kochsalzlösung.**
		D = 0,2035	0,1508	0,4713	**0,0938**	0,1322	0,4131	**0,1044**	87,7	**Zusatz von 2 ccm Bicarbonatlösung und 3 ccm Kochsalzlösung.**
		F = 0,2103	0,1558	0,4869	**0,1094**	0,1319	0,4122	**0,1035**	84,7	**Zusatz von 2 ccm Bicarbonatlösung u. 3 ccm Traubenzuckerlösung.**

Tabelle IV (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		Ergebnisse der gravimetr. Methode				Ergebn. d. titrimetr. Meth.				
Nr. des Versuchs	Verarbeitete Menge Preßsaftfiltrat ccm	Gefundene Menge Zinklactat g	Daraus berechnete Milchsäure g	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Gefundene Menge Milchsäure g	Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Preßsaft g	Titrimetrisch ermittelter Wert in Prozenten des gravimetr. gewonnenen	Bemerkungen
14	112	A = 0,1595	0,1182	0,3278	—	0,1003	0,2781	—	84,9	
	3,106:1	B = 0,1732	0,1283	0,3558	**0,0280**	0,1044	0,2895	**0,0114**	81,4	Zusatz von 5 ccm Kochsalzlösung auf 47 ccm Preßsaft.
		C = 0,2456	0,1820	0,5047	**0,1769**	0,1486	0,4120	**0,1339**	81,7	1 ccm Bicarbonatlösung, 4 ccm Kochsalzlösung.
		D = 0,2667	0,1976	0,5479	**0,2201**	0,1559	0,4323	**0,1542**	78,9	2 ccm Bicarbonatlösung, 3 ccm Kochsalzlösung.
		E = 0,2524	0,1870	0,5185	**0,1907**	0,1558	0,4320	**0,1539**	83,3	5 ccm Bicarbonatlösung.
		F = 0,2671	0,1979	0,5488	**0,2210**	0,1660	0,4603	**0,1822**	83,9	2 ccm Bicarbonatlösung, 3 ccm Traubenzuckerlsg.
15	140	A = 0,3546	0,2627	0,5630	—	0,2260	0,4843	—	86,0	
	3,0:1	B = 0,3828	0,2837	0,6080	**0,0450**	0,2445	0,5240	**0,0397**	86,2	Kein Zusatz von Bicarbonatlösung.
		C = 0,3916	0,2902	0,6219	**0,0589**	0,2582	0,5533	**0,0690**	89,0	Zusatz von 1 ccm Bicarbonatlsg. auf 60 ccm Preßsaft.
		D = 0,3937	0,2917	0,6251	**0,0621**	0,2551	0,5467	**0,0624**	87,5	Zusatz von 2 ccm Bicarbonatlsg. auf 60 ccm Preßsaft.
16	68	A = 0,1246	0,0923	0,4072	—	0,0727	0,3208	—	78,8	
	3,0:1	D = 0,1584	0,1174	0,5180	**0,1108**	0,1030	0,4544	**0,1336**	87,6	2 ccm Natriumbicarbonatlösung auf 30 ccm Preßsaft.
		F = 0,1544	0,1144	0,5047	**0,0975**	0,0916	0,4041	**0,0833**	80,1	2 ccm Natriumbicarbonatlösung und 3 ccm Traubenzuckerlösg. von 5,4%.

In den sämtlichen Versuchen dieser Tabelle erfolgte in den Bestimmungen B kein Zusatz von Natriumbicarbonatlösung, während in den Bestimmungen C, D und E dem Muskelpreßsaft steigende Mengen Natriumbicarbonat zugesetzt wurden. In den Bestimmungen F, die ich später gesondert besprechen werde, erfolgte derselbe Natriumbicarbonatzusatz wie in D, außerdem aber wurde auch Traubenzuckerlösung von 5,4% hinzugefügt.

Der Preßsaftanteil A wurde, wie immer, sofort verarbeitet, der Aufenthalt der übrigen Preßsaftportionen bei 40° dauerte in allen Fällen 60 Minuten.

In denjenigen Versuchen, in denen ein die Verdünnung des schließlich gewonnenen Preßsaftfiltrates merklich beeinflussender Zusatz von Natriumbicarbonatlösung oder Traubenzuckerlösung erfolgte, wurden sämtliche Flüssigkeiten auf gleiche Volumina gebracht.

Dieser Ausgleich erfolgte zumeist von vornherein durch Zusatz entsprechender Mengen Kochsalzlösung zu den einzelnen Preßsaftanteilen. Diese wie alle übrigen Zusätze zum frischen Preßsaft sind im einzelnen aus der Kolonne 11 der Tabelle IV ersichtlich. Nur in den beiden letzten Versuchen dieser Tabelle (Versuch 15 und 16) habe ich erst bei der Fällung nach Schenck alle Flüssigkeiten auf gleiche Volumina gebracht.

In sämtlichen Versuchen wurde neben der gravimetrischen auch die titrimetrische Milchsäurebestimmung ausgeführt.

Ich gehe nunmehr zur Besprechung der einzelnen Versuche über.

Versuch 10 wurde ganz in der üblichen Weise ausgeführt, nur daß in B kein Zusatz von Natriumbicarbonatlösung erfolgte. Das Ergebnis der gravimetrischen wie auch der titrimetrischen Bestimmung ist, daß auch hier eine sehr erhebliche Milchsäurebildung auftrat, die pro 100 ccm Preßsaft nach der Wägungsmethode (Kolonne 6) in zwei Parallelbestimmungen B 0,1414 g bzw. 0,1401 g betrug, während sich die entsprechenden Werte auf Grund der Titration zu 0,0957 g bzw. 0,1010 g (Kolonne 9) berechnen.

Aus diesem Versuch geht nur soviel hervor, daß Milchsäurebildung ohne Zusatz von Natriumbicarbonatlösung zum Preßsaft erfolgen kann, wobei allerdings daran zu denken ist, daß von vornherein die Reaktion des Preßsaftes offenbar eine sehr verschiedene sein kann.

Ein weiterer, ganz ähnlich ausgeführter Versuch, den ich wegen des Fehlens einiger analytischer Angaben nicht in die Tabelle aufnehmen konnte, zeigte in der Tat ein völliges Ausbleiben der Milchsäurebildung in dem nicht mit Bicarbonatlösung versetzten Preßsaftanteil B.

In Versuch 11 betrachten wir zunächst die Ergebnisse der gravimetrischen Methode (Kolonne 3). In zwei gut übereinstimmenden Parallelbestimmungen B (ohne Bicarbonat) ist nur eine ziemlich geringe Milchsäurebildung eingetreten, während

in C und D die Milchsäurezunahme eine recht beträchtliche ist. Die mit 2 ccm Bicarbonat versetzte Bestimmung D weist in diesem Falle keine stärkere Milchsäurebildung als die mit 1 ccm versetzte Bestimmung B auf. Die in 100 ccm Preßsaft neugebildete Milchsäuremenge (Kolonne 6) beträgt für B nur 0,015 g bezüglich 0,023 g, während sie in C und D den Wert von 0,086 g bezüglich 0,083 g erreicht.

Die titrimetrische Methode ergibt in diesem Falle kein ganz so klares Resultat. Dadurch, daß die Aldehydausbeute in A (Kolonne 10) nur 72,8 %, in B hingegen 89,4 % bezüglich 92,2 % der theoretischen Menge beträgt, erscheint die Milchsäurebildung in B weit größer als bei der gravimetrischen Bestimmung (pro 100 ccm Preßsaft 0,085 g bezüglich 0,105 g), und die Mehrzunahme in den Bestimmungen C und D, die eine prozentisch merklich schlechtere Aldehydausbeute als B lieferten, erscheint nicht so ausgeprägt, wie bei der Wägungsbestimmung.

Immerhin ergibt auch die titrimetrische Bestimmung in Versuch 11 die höchsten Milchsäurewerte für die mit Natriumbicarbonatlösung versetzten Preßsaftanteile.

Auch die Ergebnisse des Versuchs 12 sprechen nicht in völlig einwandfreier Weise zugunsten der die Milchsäurebildung begünstigenden Wirkung des Bicarbonates. Die gravimetrische Methode (Kolonne 3) ergibt hier für B ein merklich geringeres Anwachsen der Milchsäure als für C. Der für D gewonnene Wert nähert sich aber wieder sehr dem für B erhaltenen (siehe auch Kolonne 6).

Die Ergebnisse der titrimetrischen Methode sprechen in demselben Sinne. Auch hier ist in C die Milchsäurebildung ganz erheblich größer als in B, in D ist die Mehrbildung auch sehr deutlich, wenn auch merklich geringer als in C. Trotz dieser Unstimmigkeiten zeigt auch Versuch 12, wenn wir von der erst später zu besprechenden Bestimmung F absehen, in dem nicht mit Natriumbicarbonat versetzten Preßsaftanteil die geringste Milchsäurebildung.

Weit klarer erscheinen die Ergebnisse der drei folgenden Versuche.

In Versuch 13 ergibt die Wägemethode zwar in dem mit 1 ccm Natriumbicarbonatlösung versetzten Preßsaft C keine

größere Milchsäurebildung als in dem Preßsaft B, die Vermehrung der Milchsäure in dem mit 2 ccm Bicarbonat versetzten Preßsaft D ist aber merklich größer als in B und C. Die Ergebnisse der titrimetrischen Methode entsprechen dem vollkommen.

Es kann bei der, wie bereits oben erwähnt, sicherlich sehr verschiedenen Anfangsreaktion des Preßsaftes nicht wundernehmen, daß in den einzelnen Versuchen zur Erzielung einer maximalen Milchsäurebildung ein verschieden großer Zusatz von Bicarbonatlösung nötig ist.

In Versuch 14 ergibt die gravimetrische Methode für B nur ein geringes Anwachsen der Milchsäure, in C (1 ccm Bicarbonatlösung) ist die Milchsäurebildung um ein vielfaches stärker, noch stärker in D (2 ccm Bicarbonatlösung), während die in E erfolgte weitere Steigerung des Bicarbonatzusatzes auf 5 ccm zum mindesten kein weiteres Ansteigen der Milchsäurebildung im Gefolge hat. Im ganzen völlig gleichartig, wenn auch infolge der beiden Bestimmungsmethoden anhaftenden Fehler im einzelnen etwas abweichend ist auch hier das titrimetrisch gewonnene Versuchsergebnis.

Im wesentlichen ganz ähnlich, wie der eben besprochene Versuch verlief auch der Versuch 15, wenngleich die hier beobachteten Ausschläge in der Milchsäurebildung weitaus geringer sind. Die Milchsäurebildung in C (1 ccm Natriumbicarbonatlösung) ist nach der gravimetrischen wie namentlich auch nach der titrimetrischen Bestimmung merklich größer als in B. Zusatz von 2 ccm Bicarbonatlösung (Bestimmung D) hat keine weitere Vermehrung der Milchsäurebildung (nach Ausweis der titrimetrischen Methode eher eine geringfügige Verminderung) zur Folge. Es sei hervorgehoben, daß in diesem Versuch, in dem die Milchsäurezunahme relativ gering ist, der Anfangsgehalt des Preßsaftes an Milchsäure ein ganz besonders hoher ist.

Ganz kurz kann ich mich auch bei der Besprechung des Versuches 16 fassen, der vom Standpunkt der bisher besprochenen Frage eigentlich nicht in die Tabelle V gehört. Hier ist in Bestimmung D bei Zusatz von 2 ccm Bicarbonatlösung zu 30 ccm Preßsaft eine sehr erhebliche Milchsäurebildung erfolgt.

Als das Gesamtergebnis der in Tabelle IV zusammenge-

stellten Versuche, soweit sie bisher besprochen sind, darf angesehen werden, daß die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft durch Zusatz von Natriumbicarbonatlösung eine unter Umständen außerordentlich starke Vermehrung erfährt. Die Menge der zur Erzielung der größtmöglichen Milchsäurebildung nötigen Bicarbonatlösung ist von Fall zu Fall verschieden und höchstwahrscheinlich von der von vornherein vorhandenen Reaktion des Preßsaftes abhängig. (Gegen empfindliches Lackmuspapier reagierte der frische Preßsaft in allen untersuchten Fällen amphoter.) Ist durch die für die Herstellung des Preßsaftes notwendigen Manipulationen bereits mit Milchsäurebildung einhergehende Säuerung oder doch starke Abnahme der Alkalescenz erfolgt, so kann die Milchsäurebildung ohne Zusatz von Natriumbicarbonat völlig oder nahezu völlig ausbleiben.

Allem Anschein nach übt also die gebildete Milchsäure selbst einen hemmenden Einfluß auf die weitere Milchsäurebildung aus. Hiermit steht in bestem Einklang, daß — wie oben mitgeteilt — Zusatz von Säure zum Preßsaft jegliche Milchsäurebildung hintanhält.

Das beim Stehen des Muskelpreßsaftes schließlich erreichte Milchsäuremaximum ist demnach nicht nur von der Menge des vorhandenen Lactacidogens, sondern auch von der Menge der disponiblen säurebindenden Substanzen abhängig[1]).

Bei einer gewissen H-Ionen-Konzentration hört allem Anschein nach die Milchsäurebildung auf.

Die Feststellung, daß neben der Menge des von vornherein vorhandenen Lactacidogens auch die Reaktion des Preßsaftes auf die Milchsäurebildung von entscheidendem Einfluß ist, machte es notwendig, die in den Versuchen von Embden, Kalberlah und Engel gemachte Beobochtung, daß Zusatz von Traubenzucker ohne Einfluß auf den Umfang der Milchsäurebildung ist, unter etwas veränderten Bedingungen nachzuprüfen.

Es war allerdings, ganz abgesehen von den eben erwähnten Versuchen dieser Autoren, von vornherein — wie bereits in der voranstehenden Arbeit hervorgehoben wurde — äußerst

---

[1]) Als solche kommen nach Burridge vielleicht auch im lebenden Muskel Ammoniak und Kreatin resp. Kreatinin in Frage. W. Burridge Journ. of Physiol. 41, 285, 1910/11.

unwahrscheinlich, daß Traubenzucker die Muttersubstanz der im Preßsaft gebildeten Milchsäure sei, weil der Preßsaft nur Spuren Traubenzucker und überhaupt kein Glykogen enthielt.

Dennoch schien es nicht unnötig, zu prüfen, ob auch bei stärkerem Bicarbonatzusatz, als er in den Versuchen von Embden, Kalberlah und Engel erfolgte, Traubenzuckerzusatz den Umfang der Milchsäurebildung nicht beeinflußte.

In den Versuchen 12, 13, 14 und 16 der Tabelle IV habe ich außer den bereits besprochenen Milchsäurebestimmungen noch solche ausgeführt, in denen ich neben 2 ccm Natriumbicarbonatlösung dem Preßsaft 3 ccm einer Traubenzuckerlösung von 5,4 % hinzufügte. Der Bicarbonatzusatz war also ebensogroß wie in den Bestimmungen D.

In der Tabelle sind die Traubenzuckerversuche mit F bezeichnet. In Versuch 12 ist der für F ermittelte Milchsäurewert geringer als der für D erhaltene, in Versuch 13 ist er nach der gravimetrischen Methode ein wenig größer, während die titrimetrisch ermittelten Werte für D und F sehr genau miteinander übereinstimmen. Versuch 16 weist jedenfalls keine stärkere Milchsäurebildung in F als in D auf.

In Versuch 14 stimmen die gravimetrischen Werte für D und F aufs beste miteinander überein, der titrimetrische ist allerdings in F merklich höher, doch dürfte dies sehr wahrscheinlich an der Ausführung der titrimetrischen Bestimmung D liegen, bei der die Aldehydausbeute gegenüber den sämtlichen anderen Bestimmungen dieses Versuches auffällig niedrig ist.

Jedenfalls kommt das titrimetrische Ergebnis in Versuch 14 gegenüber den nach den beiden Methoden übereinstimmenden Resultaten in den Versuchen 12, 13 und 16 und dem mit diesen gleichsinnigen Ergebnis der gravimetrischen Methode in Versuch 14 selbst nicht in Betracht. Es darf als sicher angesehen werden, daß in den Versuchen von Embden, Kalberlah und Engel nicht mangelnder Alkalizusatz die Milchsäurebildung aus Traubenzucker hinderte, und die Anschauung der genannten Autoren, daß Traubenzucker jedenfalls nicht die Vorstufe bei der Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft ist, besteht auch nach meinen Versuchen zu Recht.

Es liegt sehr nahe, das am Preßsaft gewonnene Ergebnis,

daß die Milchsäurebildung sich beim Erreichen einer gewissen Acidität gleichsam selber hemmt, auch auf die Untersuchungen früherer Autoren am überlebenden Muskel zu übertragen. Namentlich könnte vielleicht die von Fletcher und Hopkins[1]) exakt erwiesene auffällige Konstanz des Säurebildungsmaximums von gleichartigen Froschmuskeln bei der Wärmestarre durch die eben geschilderten Versuche eine einfache Erklärung finden.

Fletcher und Hopkins zeigten in Übereinstimmung mit Marcuse, daß bei der Tätigkeit der isolierten Froschschenkelmuskulatur Milchsäure gebildet wird.

Ferner fanden die eben genannten Autoren, daß bei physiologischer Temperatur und ausreichender Intaktheit des Muskelgewebes unter dem Einfluß einer Sauerstoffatmosphäre die bei der Aktivität gebildete Milchsäure zu einem erheblichen Teil wieder zum Verschwinden gebracht werden kann. Das durch Wärmestarre erreichbare Milchsäurebildungsmaximum ist nun völlig gleich, einerlei, ob der frische ruhende Muskel der Wärmestarre ausgesetzt wird, ob die Wärmestarre nach der mit Milchsäurebildung einhergehenden ermüdenden Muskelreizung hervorgerufen wird, oder ob der Muskel vor Auslösung der Wärmestarre Zeit hatte, durch Ausruhen in einer Sauerstoffatmosphäre die von ihm während der Tätigkeit gebildete Milchsäure zu einem wesentlichen Teil wieder zum Verschwinden zu bringen.

Das Milchsäurebildungsmaximum bei der Wärmestarre blieb sogar gleich nach neun aufeinander folgenden Perioden von abwechselnder mit Milchsäurebildung einhergehender Muskeltätigkeit, und mit Verschwinden von Milchsäure verbundenem Ausruhen in einer Sauerstoffatmosphäre.

Fletcher und Hopkins ziehen zu Erklärung dieser eigenartigen Tatsache verschiedene Möglichkeiten in Erwägung, auf die hier nicht im einzelnen eingegangen werden kann.

Aber einerlei, ob das Verschwinden der bei der Tätigkeit gebildeten Milchsäure beim Ausruhen des Muskels in einer Sauerstoffatmosphäre durch Regeneration zur Milchsäurevorstufe oder durch Oxydation zu Kohlensäure und Wasser, oder — was wir für am wahrscheinlichsten halten möchten —

---

[1]) Fletcher und Hopkins, Lactic acid in amphibian muscle. Journ. of Physiol. 35, 1906/07.

durch ein Zusammenwirken beider Vorgänge bedingt ist, die Wirkung auf die Reaktion des Muskelpreßsaftes ist die gleiche:

Es wird eine der verschwindenden Milchsäuremenge entsprechende Abnahme der H-Ionen-Konzentration eintreten.

Wenn nun bei der Wärmestarre des Froschmuskels gar nicht ohne weiteres das gesamte überhaupt vorhandene Lactacidogen in Milchsäure umgewandelt würde, sondern der Umwandlungsprozeß ebenso wie im Muskelpreßsaft vom Säugetier bei einer bestimmten H-Ionen-Konzentration aufhörte, während noch verfügbare Milchsäurevorstufe vorhanden ist, so wären damit wohl die eben geschilderten Beobachtungen von Fletcher und Hopkins erklärbar.

Trifft dieser Erklärungsversuch zu, so ist zu erwarten, daß die bei der Wärmestarre erfolgende Milchsäurebildung durch eine künstliche Steigerung des Alkaligehaltes des Muskels vermehrt werden kann.

Die wesentlichsten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind folgende:

1. Der Vorgang der Milchsäurebildung aus dem Lactacidogen im Muskelpreßsaft verläuft außerordentlich rasch. Er kann schon nach 30 Minuten abgeschlossen sein.

2. Säurezusatz zum Preßsaft hebt die Milchsäurebildung vollkommen auf.

3. Zusatz von Natriumbicarbonat zum Preßsaft begünstigt die Milchsäurebildung. Es scheint, daß es für jeden Preßsaft einen optimalen Natriumbicarbonatzusatz gibt, über den hinaus weiterer Bicarbonatzusatz unwirksam ist.

4. Bei unzureichendem Gehalt des Preßsaftes an Alkali kommt allem Anschein nach die Milchsäurebildung nach dem Eintreten einer bestimmten H-Ionen-Konzentration durch Selbsthemmung zum Stillstand.

Inwieweit sich diese am Preßsaft erhobenen Befunde auf den lebenden und den überlebenden Muskel übertragen lassen, müssen weitere Versuche lehren. Hier sei nur an eine bereits erwähnte Arbeit von Burridge erinnert, nach welcher die Erregbarkeit der Froschmuskulatur bei Perfusion mit schwachen Milchsäurelösungen herabgesetzt wird. Bereits in der vorigen

Arbeit wurde darauf hingewiesen, daß auf Grund verschiedener Arbeiten, namentlich aus neuerer Zeit, anzunehmen ist, daß einer innerhalb des Muskelgewebes bestimmt lokalisierten Milchsäureproduktion offenbar für die Auslösung der Muskelcontraction eine wichtige Rolle zufällt. Jede Behinderung dieser Milchsäureproduktion wird daher voraussichtlich die Erregbarkeit des Muskels herabsetzen. Es erscheint zum mindesten sehr möglich, daß in den eben erwähnten Versuchen von Burridge die Ursache für die Herabsetzung der Erregbarkeit bei der Durchströmung der Froschmuskulatur mit Milchsäure eben in der Behinderung der Milchsäurebildung durch den Muskel selbst zu suchen ist.

Über Milchsäurebildung im Blute.

II. Mitteilung.

Von

Brigitte Kraske.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von H. Fries[1]) wurde gezeigt, daß menschliches Aderlaßblut von Gesunden und in verschiedenen Krankheitszuständen anscheinend fast regelmäßig geringe Mengen Milchsäure enthält und daß die Menge der Milchsäure während eines kurzen Aufenthaltes des Blutes bei Bruttemperatur sehr erheblich zunimmt.

Für die biologische Wertung dieser Beobachtung war es in erster Linie wichtig, die Quelle dieser beim Stehen des Blutes gebildeten Milchsäure zu erforschen.

Auf Grund früherer Versuche von Embden und Kraus[2]), sowie von Embden, Kalberlah und Engel[3]) mußte zunächst hauptsächlich an zwei Möglichkeiten gedacht werden.

Die erste dieser Möglichkeiten war die, daß ähnlich wie bei der künstlichen Durchblutung der Leber aus Kohlenhydrat, d. h. im wesentlichen aus dem Blutzucker, Milchsäure entstände; die zweite bestand in einer Milchsäurebildung aus einer Vorstufe besonderer Natur, wie sie sich allem Anschein nach in größter Menge in der Muskulatur vorfindet.

An die erstere Möglichkeit, an die Milchsäurebildung aus dem Traubenzucker des Blutes, mußte um so eher gedacht

---

[1]) H. Fries, diese Zeitschr. 35, 368, 1911.

[2]) Embden und Kraus, diese Zeitschr. 45, 1, 1912.

[3]) Embden, Kalberlah und Engel, diese Zeitschr. 45, 45, 1912.

werden, als es bekanntlich nach den Untersuchungen Lépines[1]) und anderer Forscher im lebensfrischen Blute bei kurzdauerndem Stehen zum Verschwinden recht erheblicher Mengen Traubenzuckers kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit suchte ich die Frage zu entscheiden, ob die beim Stehen des menschlichen Blutes auftretende Milchsäuremenge durch gleichzeitig verschwindenden Traubenzucker gedeckt wird, ob es daher möglich ist, die Milchsäurebildung im Blute als den Ausdruck einer Spaltung des Blutzuckers aufzufassen.

Bezüglich der angewandten Methodik kann ich mich ganz kurz fassen.

Das den Patienten durch Aderlaß entnommene Blut wurde in einem eisgekühlten sterilen Glasgefäß aufgefangen, durch Schlagen mit einem Glasstab defibriniert, durch sterile Gase koliert und die eine Hälfte (Blut A) sofort nach Schenck mit Salzsäure und Quecksilberchlorid enteiweißt. Die andere Hälfte (Blut B) wurde in einem sterilen, verschlossenen Glasgefäß während 2 Stunden bei 40° gehalten. Alsdann wurde Blut B genau in der gleichen Weise wie Blut A nach Schenck gefällt. Die gefällten Flüssigkeiten blieben über Nacht im Eisschrank stehen und wurden am nächsten Morgen zunächst genau in der von Fries[2]) geschilderten Weise weiter behandelt. Gemessene aliquote Teile der aus Blut A und Blut B gewonnenen, mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber und mit einem Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreiten Filtrate wurden zur Bestimmung des Zuckers und der Milchsäure verwendet.

Für die Bestimmung des Zuckers wurden gleiche Anteile der Blutfiltrate A und B bei schwach saurer Reaktion und einer 55° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers im Vakuum eingeengt und die eingeengte Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt, das annähernd dem der angewandten Filtratmenge entsprechenden Blutquantum gleich war. Die Titration des Zuckers nach Knapp geschah genau in der von Embden[3]) angegebenen und auch von Liefmann und

---

[1]) R. Lépine, Le Diabète Sucré, Paris 1909, 152 ff. Daselbst siehe auch weitere Literaturangaben.

[2]) Fries, l. c.

[3]) G. Embden, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 48, 1904.

Stern[1]), Embden, Lüthje und Liefmann[2]) usw. ausgeübten Weise.

Bei der Bestimmung der Milchsäure verfuhr ich genau ebenso, wie es von Fries geschildert wurde. Wie Fries machte ich die Beobachtung, daß das aus Blut A gewonnene Zinksalz weit schwerer und unvollständiger krystallisierte, als das aus Blut B gewonnene. Davon, daß es sich auch im Blut A um milchsaures Zink handelte, habe ich mich durch Überführung der Milchsäure in Acetaldehyd und Bestimmung der gewonnenen Aldehydmenge auf jodometrischem Wege nach einem, dem von Jerusalem angegebenen ähnlichen Verfahren überzeugt, das allerdings, wie neuerdings durch v. Fürth und Charnaß gezeigt wurde, keineswegs quantitativ brauchbare Resultate liefert, immerhin aber bei gleichartiger Anwendung zu Vergleichswerten führt, die nicht ganz wertlos sind.

Entsprechend der vollkommeneren Krystallisation des aus Blut B gewonnenen Zinksalzes wurden bei der Oxydation dieses Zinksalzes mit Kaliumpermanganat erheblich bessere Ausbeuten an Aldehyd gewonnen, als bei der gleichen Behandlung des Zinksalzes aus Blut A. Die Aldehydausbeute aus dem aus Blut B gewonnenen Zinksalze betrug im allgemeinen erheblich über 50%, während die entsprechenden Werte aus Blut A gewöhnlich merklich unter 50% der theoretischen Ausbeute blieben.

Aus dem Verhalten bei der Krystallisation des Zinksalzes und namentlich bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat scheint hervorzugehen, daß die in unseren Versuchen beobachtete Zunahme des aus dem Ätherextrakt darstellbaren Zinksalzes ganz oder nahezu ganz auf eine Zunahme der Milchsäure zurückzuführen ist.

Zur Gewinnung einwandfreier Resultate war es naturgemäß notwendig, die Milchsäure- und Zuckerbestimmungen vor und nach dem Stehen an ein und demselben Blutquantum auszuführen. Die hierfür nötige Blutmenge muß, falls nicht die Fehler der Bestimmungen gar zu groß werden sollen, nach

[1]) E. Liefmann und R. Stern, diese Zeitschr. 1, 299, 1906.

[2]) Embden, Lüthje und Liefmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 265.

dem Defibrinieren und Colieren mindestens etwa 350 ccm betragen, eine Forderung, die am Krankenbette nur selten zu erfüllen ist.

Ich habe deswegen mehrmals das Blut verschiedener Kranken gemeinschaftlich verarbeitet, derart, daß ich einander gleiche Filtratmengen A und B eines Patienten mit einander gleichen Filtratmengen A und B eines zweiten Patienten mischte, ein Verfahren, das bei der völlig gleichen Vorbehandlung als durchaus statthaft erschien.

Die 5 an dem Blute von 7 Patienten von mir vorgenommenen Versuche sind in einer Tabelle zusammengestellt. In den Versuchen 1 bis 4 wurden genaue Zuckerbestimmungen ausgeführt, während in Versuch 5 wegen Materialmangels nur eine aproximative Bestimmung vorgenommen werden konnte.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nr.	Patient	Erkrankung	Im ganzen gewonnene Blutmenge ccm	Von Blut A u. Blut B zur Zuckerbestimmung verwandte Filtratmenge ccm	Zucker in 100 ccm Blut A g	Zucker in 100 ccm Blut B g	Von Blut A u. Blut B zur Milchsäurebestimmung verwandte Filtratmenge ccm	Aus Blut A gewonnenes Zinksalz g	Aus Blut B gewonnenes Zinksalz g	Für 100 ccm Blut A berechnete Milchsäuremenge g	Für 100 ccm Blut B berechnete Milchsäuremenge g	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Blut B g	Abnahme des Traubenzuckers in 100 ccm Blut B g
1	K. u. He.	K.: Nephritis, fieberfrei. He.: Lues cerebrospin., fieberfrei.	240 + 260 = 500	292	0,085	0,0576	877	0,041	0,081	0,020	0,041	0,021	0,028
2	Ho.	Bandwurm, fieberfrei.	350	304	0,096	0,076	506	0,026	0,043	0,015	0,038	0,023	0,021
3	Fr.	Lues, fieberfrei.	360	293	0,116	0,096	586	0,025	0,052	0,019	0,039	0,020	0,020
4	E. u. I.	E.: gesund. I.: Herzinsuffizienz, fieberfrei.	180 + 370 = 550	309	0,108	0,070	926	0,049	0,110	0,024	0,053	0,029	0,037
5	L.	Nervöse Herzbeschwerden, fieberfrei.	250	99	0,079	0,066	501	0,011	0,049	0,010	0,043	0,033	0,012

In Kolonne 5 der Tabelle sind die zur Zuckerbestimmung verwendeten Filtratmengen, die, da bei der Schenckschen Fällung das Blut auf das 6fache seines Ausgangsvolumens verdünnt wird, gleich dem 6fachen der angewendeten Blutmenge sind, angegeben, in Kolonnen 6 und 7 finden sich die Zuckermengen in Grammprozenten von Blut A und Blut B. Wie man sieht, ist, wenn man von der ungenauen Zuckerbestimmung in Versuch 5 absieht, während des 2stündigen Stehens des Blutes bei 40° eine ganz erhebliche Abnahme des Traubenzuckers eingetreten, deren Betrag in Grammprozenten aus Kolonne 14 zu ersehen ist.

Die näheren Angaben über die Milchsäurebestimmungen finden sich in den Kolonnen 8 bis 13: in Kolonne 8 die wiederum dem 6fachen des Blutes entsprechende zur Bestimmung verwendete Filtratmenge, in den Kolonnen 9 und 10 die Mengen des aus dem Ätherextrakt dieser Filtratmengen gewonnenen, wasserfreien Zinksalzes. In den Kolonnen 11 und 12 sind diese Werte auf Grammprozente freier Milchsäure umgerechnet.

Was zunächst die Milchsäurewerte im Blut A (Kolonne 11) betrifft, so gehören sie alle der gleichen Größenordnung an, nur Versuch 5 fällt auch hier etwas aus der Reihe. In diesem Versuch beträgt die aus dem sofort verarbeiteten Blute gewonnene Milchsäuremenge 11 mg pro 100 ccm Blut, während sie in den übrigen zwischen 15 und 24 mg pro 100 ccm schwankt. Auch die weit höheren (im Minimum um 100°/₀) Werte aus Blut B sind einander überaus ähnlich. Sie schwanken nur zwischen 38 mg (Versuch 2) und 53 mg (Versuch 4) pro 100 ccm.

Die aus den Kolonnen 11 und 12 berechnete Zunahme der Milchsäure pro 100 ccm Blut ist aus Kolonne 13 ersichtlich; sie schwankt zwischen 21 mg (Versuch 1) und 33 mg (Versuch 5) pro 100 ccm.

Wie verhält sich nun die Menge der beim Stehen des Blutes gebildeten Milchsäure zu der Menge des unter den gleichen Verhältnissen verschwindenden Traubenzuckers?

Das geht unmittelbar aus der Vergleichung der Kolonnen 13 (gebildete Milchsäure in 100 ccm Blut) und 14 (aus 100 ccm Blut verschwundener Traubenzucker) hervor. In Versuch 1

sind 21 mg Milchsäure gebildet und gleichzeitig 28 mg, also etwas mehr, Traubenzucker verschwunden. In den Versuchen 2 und 3 stimmen die Mengen der gebildeten Milchsäure und die des verschwindenden Traubenzuckers völlig oder doch innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung miteinander überein. In Versuch 4 sind 29 mg Milchsäure gebildet und 37 mg, also ein wenig mehr Traubenzucker verschwunden. Mit den Ergebnissen dieser ersten 4 Versuche stimmt das des Versuches 5 nicht überein. Hier sind 33 mg Milchsäure gebildet und nur 12 mg Traubenzucker verschwunden. Ich will aber nochmals hervorheben, daß die der Berechnung zugrunde liegende Bestimmung nur mit recht mangelhafter Genauigkeit durchgeführt werden konnte, so daß der Wert derselben nur ein sehr bedingter ist.

In den Versuchen 1 bis 4 ist die beim Stehen des Blutes auftretende Milchsäuremenge, um es nochmals zu wiederholen, der gleichzeitig verschwundenen Traubenzuckermenge gleich, oder sie ist etwas geringer als diese. In diesen 4 Fällen steht also der Annahme, daß die beim Stehen des Blutes gebildete Milchsäure als ein Spaltprodukt des Blutzuckers aufzufassen ist, nichts im Wege. Ob das abweichende Resultat in Versuch 5 auf analytische Fehler oder auf irgendwelche andere Umstände, z. B. auf das Vorhandensein einer zuckerbildenden Substanz[1]) im Blute, die in diesem Falle die Glykolyse verdeckte, zurückzuführen ist, kann nicht ohne weiteres entschieden werden. Das übereinstimmende Ergebnis der übrigen Versuche berechtigt aber jedenfalls zu dem Schlusse, daß die bei kurzdauerndem Stehen gebildete Milchsäure im lebensfrischen Menschenblute als ein Abbauprodukt des Traubenzuckers aufzufassen ist. Allem Anschein nach wird bei diesem Abbau des Traubenzuckers eine dem Traubenzucker gleiche Milchsäuremenge gebildet, also aus je einem Molekül Traubenzucker zwei Moleküle Milchsäure.

Hiernach ist die sogenannte Glykolyse im Blute ein chemisch wohl definierter Prozeß und in völlige Analogie zu setzen mit der bei künstlicher Durchblutung der Leber beobachteten Milchsäurebildung aus Kohlenhydrat, und die Vor-

---

[1]) „Virtueller Zucker“ von Lépine, l. c.

stellung, daß der Hauptweg des Kohlenhydratabbaues im Organismus über Milchsäure führt, gewinnt gerade durch die vorliegenden Versuche ganz erheblich an Wahrscheinlichkeit, weil eben dem verschwindenden Traubenzucker annähernd gleiche Milchsäuremengen auftreten.

Es wäre an sich möglich, daß während des 2stündigen Stehens des Blutes neben der Milchsäurebildung auch eine Milchsäurezerstörung — etwa unter Oxydation zu Kohlensäure und Wasser — einhergeht. Jedoch tritt dieser Vorgang der Milchsäurezerstörung, wenn er überhaupt sich abspielt, in seinem Umfange so sehr hinter dem der Milchsäurebildung zurück, daß er in meinen Versuchen nicht oder wenigstens nicht genügend eindeutig zum Ausdruck kommt. Hiermit steht im besten Einklange, daß nach den Versuchen von Otto Warburg[1]) die roten Blutzellen normaler, erwachsener Menschen einen meßbaren oxydativen Stoffwechsel nicht zeigen.

Zum Schlusse möchte ich nochmals darauf hinweisen, daß die von mir gewonnenen Zinksalze, die der Berechnung der beim Stehen des Blutes auftretenden Milchsäure zugrunde liegen, keineswegs als reines Zinklactat aufzufassen waren. Ich erwähnte bereits, daß übereinstimmend mit den Erfahrungen von Fries das Zinksalz aus Blut B weit vollständiger und leichter als das aus Blut A krystallisierte, und daß die aus dem Blut B gewonnenen Zinksalze eine bessere Ausbeute an Acetaldehyd lieferten, als die aus Blut A.

Ich will an dieser Stelle aus einigen nachfolgenden Arbeiten vorweg nehmen, daß offenbar beim Stehen des Blutes die absolute Menge der schließlich das gewogene Zinksalz verunreinigenden Substanzen sich nicht ändert, d. h., daß die Zunahme des Gewichtes des Zinksalzes aus Blut B ausschließlich auf Kosten neugebildeter Milchsäure erfolgt.

Wenn dies zutrifft, so dürfen die von mir gefundenen Werte für die Milchsäurezunahme beim Stehen des menschlichen Blutes, trotzdem es nicht gelingt, die Milchsäure in Form eines ganz reines Salzes quantitativ zu isolieren, als praktisch richtig angesehen werden.

---

[1]) O. Warburg, Zur Biologie der roten Blutzellen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 59, 114, 1909.

Über Milchsäurebildung im Blute.

III. Mitteilung.

Von

Kura Kondo.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In der dieser vorangehenden Arbeit von B. Kraske wurde der Nachweis erbracht, daß die bei kurzdauerndem Stehen von menschlichem Blute auftretende Vermehrung der Milchsäure ihrer Menge nach durch gleichzeitig aus dem Blute verschwindenden Traubenzucker gedeckt wird. Danach steht — für das menschliche Blut wenigstens — der Annahme nichts im Wege, daß die während des Stehens gebildete Milchsäure ein Abbauprodukt des Blutzuckers ist, und daß umgekehrt die von Lépine zuerst beobachtete Glykolyse im Blute ihrem Wesen nach nichts anderes ist, als ein Abbau des Traubenzuckers zu Milchsäure.

Für die Herkunft der Milchsäure aus gleichzeitig verschwindendem Traubenzucker wurden außer der bereits eben erwähnten Tatsache, daß eine der auftretenden Milchsäuremenge mindestens gleiche Traubenzuckermenge beim Stehen des Blutes verschwindet, Beweise nicht erbracht.

Es war also nicht völlig ausgeschlossen, daß der von B. Kraske beobachtete Parallelismus zwischen auftretender Milchsäure und verschwindendem Traubenzucker ein mehr zufälliger war, um so mehr, als diese Untersuchungen ausschließlich an menschlichem Blute unter stets sehr ähnlichen Bedingungen angestellt wurden.

Die Ausführung entsprechender Untersuchungen an einem anderen Versuchsobjekt erschien somit in hohem Maße erwünscht.

Ich habe daher die Versuche von Fräulein Kraske auf Hundeblut übertragen und will in folgendem die Ergebnisse meiner Untersuchungen kurz wiedergeben.

Bezüglich der Versuchsmethodik sei folgendes bemerkt:

Die Entnahme des Hundeblutes geschah (mit einer Ausnahme) stets ohne Anwendung von Narkose durch Punktion der Vena jugularis am nicht gefesselten, sondern nur durch einige Diener festgehaltenen Hunde. Bei geschickter Ausführung wird der Hund durch diesen Eingriff kaum belästigt.

Für den Zweck der vorliegenden Untersuchungen ausreichende Blutmengen (einige 100 ccm) konnten bei Verwendung von Hunden von 15 bis 20 kg Körpergewicht ohne weiteres gewonnen werden. In wenigen Fällen habe ich für meine Versuche auch Mischblut von zwei Hunden angewandt.

Die Verarbeitung des Blutes geschah zunächst ganz in der früher geschilderten Weise. Es wurde der größte Wert auf sorgfältige Sterilisierung aller mit dem frischen Blute in Berührung kommender Gerätschaften verwendet. In keinem Falle dauerte der Aufenthalt des Blutes B bei 40° länger als zwei Stunden. Meist währte er nur 90 Minuten.

Bezüglich der Technik der Zuckerbestimmung habe ich den Angaben von Fräulein Kraske nichts hinzuzufügen.

Die Milchsäurebestimmung hat dagegen in meinen Versuchen eine sehr wesentliche Verbesserung erfahren. Ich wandte nämlich, nachdem ich in der früher geschilderten Weise aus dem Ätherextrakt der Blutfiltrate über das Bleisalz das Zinksalz dargestellt und in einem Teil der Fälle gewogen hatte, nicht wie Fräulein Kraske die Methode von Jerusalem zur Überführung des Zinklactats in Acetaldehyd an, sondern bediente mich der im hiesigen Institut wesentlich verbesserten Methode von v. Fürth und Charnaß, die in Abderhaldens Lehrbuch der biochemischen Arbeitsmethoden **5**, 1256, geschildert ist.

In 3 von 5 angestellten Versuchen sah ich übrigens von einer Wägung des Zinksalzes ab und begnügte mich damit, an der eingeengten Lösung dieses Zinksalzes direkt die Fürth-Charnaßsche Methode auszuführen.

Bevor ich meine Hauptversuche unter gleichzeitiger Bestimmung von Zucker und Milchsäure vor und nach dem Stehen

bei 40° ausführte, überzeugte ich mich in einer größeren Anzahl von Fällen von dem Umfang der Glykolyse in dem durch Punktion entnommenen Hundeblut.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nr.	Blut B bleibt bei 40° Min.	Verarbeitete Filtratmenge von Blut A und B ccm	Das Filtrat wird eingeengt auf ccm	In der eingeengten Filtratmenge von Blut A gefundene Zuckermenge g	In der eingeengten Filtratmenge von Blut B gefundene Zuckermenge g	In 100 ccm Blut A gefundene Zuckermenge g	In 100 ccm Blut B gefundene Zuckermenge g	Abnahme des Zuckers in 100 ccm Blut g	Abnahme d. Zuckers in % des Ausgangswertes
1	120	580	50	0,0806	0,0562	0,083	0,058	0,025	30
2	120	500	50	0,0588	0,0400	0,071	0,048	0,023	32
3	120	415	50	0,0666	0,0450	0,096	0,065	0,031	32
4	90	350	50	0,0450	0,0263	0,077	0,045	0,032	42
5	90	475	50	0,0495	weniger als 0,208	0,062	wenig. als 0,026	mehr als 0,036	mehr als 58
6	90	600	50	0,0633	0,0314	0,063	0,031	0,032	51
7	100	450	50	0,0574	0,0231	0,076	0,031	0,045	59
8	90	415 (abgerundet)	50	0,0413	0,0239	0,060	0,034	0,026	43
9	90	450	50	0,0430	0,0262	0,057	0,035	0,022	39
10	90	458	50	0,0549	0,0325	0,072	0,043	0,029	40
11	90	322	50	0,0370	0,0248	0,069	0,046	0,023	33
12	90	405	50	0,0435	0,0254	0,064	0,038	0,026	41
13	60	327	50	0,0360	0,0146	0,066	0,027	0,039	59
14	90	435	85	0,0752	0,0457	0,104	0,063	0,041	39

Diese Vorversuche sind in der vorstehenden Tabelle I, Versuche 1 bis 9, ausgeführt, während die Versuche 10 bis 14 dieser Tabelle die Zuckerbestimmungen an denjenigen Blutproben enthalten, an denen gleichzeitig auch Milchsäurebestimmungen ausgeführt wurden. In dieser Tabelle sind die notwendigen analytischen Einzelheiten enthalten. In Kolonne 7 findet sich der für 100 ccm Blut sofort nach der Entnahme ermittelte Zuckergehalt des Hundeblutes, der sich innerhalb der mittels der gleichen Methode von Embden, Lüthje und Liefmann gelegentlich ihrer Untersuchungen über die Einwirkung der Außentemperatur auf den Blutzuckergehalt ermittelten Grenzen hält.

Aus Kolonne 8 ist der entsprechende Wert für das Blut, das bei 40° gestanden hat, ersichtlich. Der Zuckergehalt dieses

Blutes (Blut B) ist in allen Fällen ganz wesentlich niedriger als der des sofort verarbeiteten Blutes A.

Die auf 100 ccm Blut berechnete Abnahme des Zuckers schwankt zwischen 0,022 g in Versuch 9 und 0,045 g in Versuch 7. In Prozenten des ursprünglich vorhandenen Zuckers beträgt die Abnahme minimal 30 % in Versuch 1 und maximal 59 % in den Versuchen 7 und 13.

Wie verhält sich nun zu diesen verschwindenden Zuckermengen die Menge der neugebildeten Milchsäure?

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr.	In den Milchsäurebestimmungen verwandte Filtratmenge ccm	Aus dem Filtrat von Blut A gewonnene Menge Zinksalz; daraus berechnete Menge Milchsäure g	Aus dem Filtrat von Blut B gewonnene Menge Zinksalz; daraus berechnete Menge Milchsäure g	Durch Titration gefundene Menge Milchsäure im Filtrat aus Blut A g	Durch Titration gefundene Menge Milchsäure im Filtrat von Blut B g	Auf Grund der Titration berechnete Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Blut B (eingeklammert die auf Grund der Wägung berechneten Werte) g	Abnahme des Traubenzuckers in 100 ccm Blut g
10	916	—	—	0,0297	0,0549	0,017	0,029
11	968	0,0307 Zn-Salz 0,0227 Milchsäure	0,0562 Zn-Salz 0,0416 Milchsäure	0,0135	0,0306	0,0106 (0,0117)	0,023
12	810	—	—	0,0268	0,0574	0,0227	0,026
13	653	—	—	0,0112	0,0265	0,0141	0,039
14	333	0,0347 Zn-Salz 0,0256 Milchsäure	0,0461 Zn-Salz 0,0340 Milchsäure	0,0139	0,0225	0,0156 (0,0151)	0,041

Das ist aus Tabelle II ersichtlich, in der die in den Versuchen 10 bis 14 vorgenommenen Milchsäurebestimmungen zusammengestellt sind. Wägungsbestimmungen der Milchsäure als Zinksalz wurden nur in den Versuchen 11 und 14 ausgeführt. In den übrigen Versuchen wurde, wie bereits oben erwähnt, die Lösung der Zinksalze nach starkem Einengen direkt der Methode von v. Fürth und Charnaß unterworfen. Aus Kolonne 5 der Tabelle II sind diese titrimetrischen Werte für Blut A, aus Kolonne 6 die entsprechenden Werte für Blut B ersichtlich.

Wie man sieht, hat in allen Fällen während des mit einer Ausnahme (Versuch 13) 90 Minuten langen Stehens des Blutes bei 40° eine ganz erhebliche Zunahme der Milchsäuremenge stattgefunden. Diese Zunahme beträgt in 3 von den 5 Ver-

suchen (Versuche 11, 12, 13) mehr als 100 % des Ausgangswertes.

In Kolonne 7 sind die in den einzelnen Versuchen beobachteten Milchsäurezunahmen auf 100 ccm Blut umgerechnet. Sie schwanken zwischen fast 11 und fast 23 mg.

Kolonne 8 wiederholt die bereits in Tabelle I, Kolonne 9, berechneten Zuckerabnahmen pro 100 ccm Blut.

Wie man sieht, reicht die Menge des verschwindenden Zuckers in allen Fällen aus, um die gleichzeitig auftretende Milchsäuremenge zu decken.

Bei einem Vergleich der Kolonnen 7 und 8 meiner Tabelle II mit den entsprechenden Zahlen der Arbeit von B. Kraske (Tabelle II, Kolonne 13 und 14) fällt auf, daß im Verhältnis zur gebildeten Milchsäure in meinen Versuchen, mit Ausnahme von Versuch 12, die Menge des verschwindenden Zuckers wesentlich größer als in denen von B. Kraske ist.

Man könnte denken, daß dieser Unterschied bedingt sei durch die Verschiedenheit der der Berechnung zugrunde liegenden chemischen Methodik.

Die Zahlen von Fräulein Kraske für die Zunahme der Milchsäure sind nämlich aus den Mengen gewogenen, wasserfreien Zinksalzes ermittelt, während meiner Berechnung die Überführung von v. Fürth-Charnaß zugrunde liegt. Ich glaube aber, daß diese Erklärung nicht zutrifft. Wohl sieht man aus einem Vergleich der in den Kolonnen 4 und 5 für die Versuche 11 und 14 wiedergegebenen Werte für wasserfreies Zinksalz und der daraus berechneten Milchsäurewerte mit den titrimetrischen Werten in Kolonne 5 und 6, daß die letzteren ganz erheblich niedriger als die durch Wägung gewonnenen sind, daß also fraglos das gewonnene Zinklactat in allen Fällen sehr stark verunreinigt war. Berechnet man aber die Zunahmen pro 100 ccm Blut an Milchsäure in den Versuchen 11 und 14 auf Grund der Wägungsresultate — siehe die eingeklammerten Zahlen in Kolonne 7 —, so bemerkt man, daß diese Zahlen kaum von den titrimetrisch ermittelten abweichen. Das ist nur so erklärlich, daß die Menge der Verunreinigung im Blut A und B die gleiche ist, oder anders ausgedrückt, daß das Mehr an Zinksalz in den Versuchen B wirklich nur ein Mehr von Zinklactat ist. Wenn, was ich für sehr wahrscheinlich halte,

auch in den Versuchen von Fräulein Kraske dies ebenfalls der Fall war, so dürfen auch die von ihr ermittelten Werte für die Milchsäurezunahme beim Stehen des Blutes, trotzdem sie ausschießlich mit der Wägungsmethode ermittelt wurden, als hinreichend exakt angesehen werden.

Meine Versuche zeigen in Übereinstimmung mit denen von B. Kraske an menschlichem Blute gewonnenen Ergebnissen, daß die bei kurz dauerndem Stehen von lebensfrischem Hundeblut bei Körpertemperatur auftretenden Milchsäuremengen durch gleichzeitig verschwindenden Traubenzucker gedeckt sind. Es scheint, daß im Hundeblut im Verhältnis zur auftretenden, oder richtiger gesagt, am Schluß des Versuches nachweisbaren Milchsäure, mehr Zucker verschwindet als im Menschenblut. Auch die Versuche am Hundeblut stehen jedenfalls mit der Annahme im besten Einklang, daß die Glykolyse im Blute ihrem Wesen nach nichts anderes ist, als der Abbau von Traubenzucker über Milchsäure.

Über Milchsäurebildung im Blute.

IV. Mitteilung.

Von

Karl von Noorden jun.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In den voranstehenden Arbeiten von B. Kraske und Kura Kondo konnte gezeigt werden, daß die Milchsäurebildung, die bei kurzdauerndem Stehen von Menschenblut und von Hundeblut auftritt, ihrer Menge nach gedeckt wird von gleichzeitig verschwindendem Traubenzucker.

Hieraus wurde gefolgert, daß allem Anschein nach, ganz ähnlich wie in den Leberdurchblutungsversuchen von Embden und Kraus, auch im Blute ohne Mitwirkung eines weiteren Gewebes Traubenzucker zu Milchsäure abgebaut werden kann. Da, besonders in den von B. Kraske vorgenommenen Versuchen an menschlichem Blute, nicht viel weniger Milchsäure beim Stehen des Blutes auftritt, als Traubenzucker verschwindet, wurde es fernerhin als wahrscheinlich angesehen, daß der Weg des Traubenzuckerabbaues ganz oder nahezu ganz über Milchsäure führt, daß die Glykolyse im Blute ihrem Wesen nach also nichts anderes ist, als Traubenzuckerabbau unter Milchsäurebildung.

So wahrscheinlich die eben erwähnten Vorstellungen durch die Untersuchungen von Kraske und Kondo geworden waren, so sehr schien es erwünscht, weitere Beweise für ihre Gültigkeit beizubringen.

Es ist eine bereits von Lépine festgestellte Tatsache, daß die Glykolyse an die zellulären Elemente des Blutes gebunden ist (Lépine ist geneigt, glykolytische Kraft nur den Leuko-

cyten zuzuerkennen), daß hingegen im Serum bei kurzdauerndem Stehen eine Abnahme des Zuckers nicht stattfindet.

Wenn wirklich die beim Stehen des Blutes auftretende Milchsäure als ein Abbauprodukt des Blutzuckers aufzufassen war, so mußte demnach das Auftreten von Milchsäure beim Stehen des Blutes auf die Formelemente beschränkt bleiben, es mußte ausbleiben beim Stehen des durch Zentrifugieren gewonnenen Blutserums. Solche Versuche, in denen das Verhalten der Milchsäure beim Stehen der Blutkörperchen und des Serums für sich festgestellt wurde, führten die Herren Dr. Elfér und Dr. Piantoni im hiesigen Institut aus. Da beide Herren ihre Versuche vorzeitig abbrechen mußten, will ich deren Ergebnis an einigen Beispielen kurz mitteilen. Bezüglich der Technik sei vorausgeschickt, daß das in Äthernarkose durch Entblutung aus den Carotiden (Tabelle I, Versuch 1) oder durch Venaepunktion ohne Narkose gewonnene Hundeblut (Tabelle I, Versuche 2 bis 4) in einem eisgekühlten Gefäß aufgefangen, durch Schlagen defibriniert und unter möglichst sorgfältigen aseptischen Maßnahmen und unter dauernder Kühlhaltung in einer sehr rasch laufenden Zentrifuge kurze Zeit zentrifugiert wurde. Das abgesaugte Serum wurde zur Beseitigung geringer Mengen noch vorhandener Formelemente nochmals zentrifugiert und nunmehr stets ganz zellfrei erhalten.

Die beim ersten Zentrifugieren gewonnenen Blutkörperchen, denen natürlich noch erhebliche Serummengen beigemengt waren, wurden gründlich gemischt, und zwei gemessene gleiche Teile weiter verarbeitet: Die Blutkörperchen A wurden sofort mit dem gleichen Volumen Wasser, dem $2^1/_2$fachen Volumen Salzsäure von $2^0/_0$ und dem $2^1/_2$fachen Volumen Quecksilberchloridlösung von $5^0/_0$ gefällt[1]), so daß bei der Fällung das ursprüngliche Blutkörperchenvolumen auf das 7fache verdünnt wurde. Die Blutkörperchen B blieben unter Zusatz der gleichen Menge Kochsalzlösung von $0{,}85^0/_0$ 60 bis 160 Minuten bei 40° stehen (siehe Tabelle I, Kolonne 3) und wurden dann ebenso wie die Blutkörperchen A mit dem je $2^1/_2$fachen Volumen Salzsäure und Quecksilberchloridlösung versetzt.

---

[1]) Die hier bei der Schenckschen Fällung angewandten größeren Salzsäure- und Quecksilberchloridlösungsmengen waren bei dem hohen Eiweißgehalt der Blutkörperchen notwendig.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr. des Versuchs	Angewandtes Blut, Art der Gewinnung des Blutes	Blut B blieb bei 40°	Milchsäure i. d. Blutkörperchen			Milchsäure im Serum	
			Milchsäure in 100 ccm Blutkörperchen A	Milchsäure in 100 ccm Blutkörperchen B	Zunahme der Milchsäure in 100 ccm Blutkörperchen B	Milchsäure in 100 ccm Serum A	Milchsäure in 100 ccm Serum B
		Min.	g	g	g	g	g
1	500 ccm durch Entblutung in Äthernarkose gewonnenes Hundeblut	160	0,068	0,092	0,024	0,067	0,064
2	500 ccm durch Venaepunktion ohne Narkose gewonnenes Hundeblut	60	0,024	0,044	0,020	0,035	0,034
3	500 ccm wie bei Versuch 2 gewonnenes Hundeblut	120	0,014	0,056	0,042	0,020	0,016
4	700 ccm wie bei Versuch 2 gewonnenes Hundeblut	120	0,009	0,039	0,030	0,012	0,013

Das Serum A wurde sofort in der üblichen Weise, d. h. unter 6facher Verdünnung nach Schenck gefällt, während das Serum B gleich lange wie die Blutkörperchen B bei 40° stehen blieb. In der Tabelle I sind nur die auf 100 ccm Blutkörperchen resp. Serum umgerechneten Milchsäurewerte wiedergegeben. Die Milchsäurebestimmungen wurden nach von Fürth und Charnaß genau in der gleichen Weise, wie es von Embden[1]) beschrieben wurde, durch Überführung der Milchsäure in Acetaldehyd und Titration des gewonnenen Acetaldehyds nach Ripper ausgeführt.

Aus den Kolonnen 4 bis 6 ist das Verhalten der Milchsäure beim Stehen der Blutkörperchen, aus den Kolonnen 7

[1]) Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden l. c.

bis 8 das Verhalten der Milchsäure beim Stehen des Serums ersichtlich. Kolonnen 4 und 5 geben den Prozentgehalt der Blutkörperchen an Milchsäure vor und nach dem Stehen bei 40° an. Wie man sieht, ist in den sämtlichen 4 Versuchen in B, ganz übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kraske und Kondo, eine ganz erhebliche Vermehrung der Milchsäure eingetreten, deren Umfang, wie aus Kolonne 6 ersichtlich ist, zwischen 20 und 42 mg pro 100 ccm Blutkörperchen schwankt.

Ganz anders ist das Verhalten der Milchsäure beim Stehen des Serums. Die Kolonnen 7 und 8 weisen kaum außerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung gelegene Unterschiede zwischen dem Milchsäuregehalt des Serums A und B auf. Wenn man überhaupt auf die beobachteten Unterschiede Wert legen will, was uns nicht berechtigt erscheint, so ist in den Versuchen 1 bis 3 eine minimale Verminderung, in Versuch 4 eine ebenso geringfügige Vermehrung der Milchsäure im Serum eingetreten.

Demnach stimmen die von den Herren Elfér und Piantoni bezüglich der Milchsäurebildung im Serum festgestellten Tatsachen vollkommen mit der Annahme überein, daß die beim Stehen des Blutes auftretende Milchsäure ein Abbauprodukt des Blutzuckers ist: da im Serum allein kein Zuckerabbau erfolgt, kann hier auch eine Milchsäurebildung nicht eintreten.

Wenn wirklich die beim Stehen des Blutes auftretende Milchsäure als ein Produkt der Glykolyse aufzufassen war, so lag es nahe zu versuchen, ob beim Stehen des Blutes unter Zusatz von Traubenzucker größere Mengen von Milchsäure gebildet würden, als ohne Zusatz von Traubenzucker oder, besser noch, bei einer künstlich herbeigeführten, möglichst großen Traubenzuckerarmut.

Derartige Versuche habe ich auf Veranlassung von Professor Embden ausgeführt.

Methodisches.

Ich wendete, mit Ausnahme eines Versuches, in dem durch Venaepunktion gewonnenes Menschenblut zur Anwendung gelangte, in den hier zu besprechenden Versuchen ausschließlich Hundeblut an, das in Äthernarkose durch Entbluten aus den

Carotiden gewonnen wurde. Das in eisgekühltem Gefäß aufgefangene Blut wurde defibriniert, koliert und in vorher mit Eis gekühlten Gläsern zentrifugiert. Auch meine Versuche wurden unter möglichst vollständiger Asepsis ausgeführt.

Das Serum wurde, ohne Rücksicht auf etwa vorhandene Formelemente, abpipettiert und beseitigt. Die Blutkörperchen wurden in den Zentrifugengläsern mit einer, dem entfernten Serum annähernd entsprechenden, eiskalten, sterilen Kochsalzlösung von 0,85 % versetzt, gründlich durchgeschüttelt und wiederum zentrifugiert.

Die wieder abgehobene Kochsalzlösung wurde durch frische ersetzt, und die Waschung der Blutkörperchen genau in der eben geschilderten Weise wiederholt. Nach möglichster Entfernung der zweiten Waschflüssigkeit wurde die ganze Menge gewonnener Blutkörperchen in einem sterilen und gekühlten Erlenmeyerkolben gemischt und die für die Einzelversuche erforderlichen Portionen abgemessen.

Eine Portion blieb unter Zusatz des gleichen Volumens Kochsalzlösung während 120 Minuten bei 40° stehen. Zu einer anderen gleichen Portion wurde eine in den verschiedenen Versuchen wechselnde Menge Traubenzucker in Form einer (annähernd isotonischen) Lösung von 5,4 % zugesetzt. Die Flüssigkeit wurde mit Kochsalzlösung von 0,85 % auf das gleiche Volumen wie die nicht mit Zucker versetzte Portion gebracht. Wir wollen die nicht mit Zucker versetzten Portionen mit B_1, diejenigen, die einen Zuckerzusatz erhielten, mit B_2 bezeichnen.

Während ich mich in einem Teil meiner Versuche mit den eben erwähnten B-Versuchen begnügte, mich also darauf beschränkte, festzustellen, ob von zwei ganz gleichen, gewaschenen Blutkörperchenportionen bei Bluttemperatur die mit Traubenzucker versetzte mehr Milchsäure bildete, als die ohne Traubenzuckerzusatz, habe ich in einer Reihe weiterer Versuche außerdem die sofort nach dem Zentrifugieren in den Blutkörperchen vorhandene Milchsäuremenge bestimmt. Diese Bestimmungen sind in der nebenstehenden Tabelle II als Milchsäurebestimmungen A in den Kolonnen 6 bis 8 verzeichnet.

Ich will gleich hier erwähnen, daß ich außer Milchsäurebestimmungen auch zahlreiche Zuckerbestimmungen anstellte,

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
					Milchsäurebestimmung in Blut A			Milchsäurebestimmung in Blut B_1 (ohne Zuckerzusatz)			Milchsäurebestimmung in Blut B_2 (mit Zuckerzusatz)						
Nr. des Versuchs	Blutart	Menge der für jeden Einzelversuch verwendeten gewaschenen Blutkörperchen ccm	Dauer des Aufenthaltes der Blutkörperchen B bei 40° Min.	Für jede Milchsäurebestimmung verwandte Filtratmenge ccm	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösung ccm	Daraus berechn. Menge Milchsäure g	Daraus berechn. Milchsäuremenge d. Blutkörperchen %	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösung ccm	Daraus berechn. Menge Milchsäure g	Daraus berechn. Milchsäuremenge d. Blutkörperchen %	Den Blutkörperchen B_2 zugesetzte Traubenzuckermenge in g u. % d. Blutkörperch.	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösung ccm	Daraus berechn. Menge Milchsäure g	Daraus berechn. Milchsäuremenge d. Blutkörperchen %	In 100 ccm Blutkörperchen B_1 neugebildete Milchsäuremenge g	In 100 ccm Blutkörperchen B_2 neugebildete Milchsäuremenge g	In 100 ccm Blutkörperchen B_2 mehr als in 100 ccm B_1 gebildete Milchsäuremenge g
5	Hundeblut	70	120	390	—	—	—	3,3	0,0149	**0,0266**	0,108 g =0,154%	4,35	0,0196	**0,0352**	—	—	**0,0086**
6	Durch Venaepunktion einem fieberlosen Augenkranken entnommenes Blut	100	120	500	—	—	—	4,35	0,0196	**0,0274**	0,324 g =0,324%	6,8	0,0306	**0,0428**	—	—	**0,0154**
7	Hundeblut	140	120	750	—	—	—	11,3	0,0509	**0,0475**	0,432 g =0,360%	14,0	0,0630	**0,0588**	—	—	**0,0113**
8	„	100	120	450	—	—	—	5,1	0,0230	**0,0358**	0,378 g =0,378%	8,9	0,0401	**0,0624**	—	—	**0,0266**
9	„	80	120	410	—	—	—	3,1	0,0140	**0,0239**	0,270 g =0,338%	5,9	0,0266	**0,0454**	—	—	**0,0215**
10	„	80	120	325	1,6	0,0072	**0,0155**	3,55	0,0160	**0,0345**	0,362 g =0,453%	7,7	0,0347	**0,0747**	0,0190	0,0592	**0,0402**
11	„	130	120	500	1,2	0,0054	**0,0076**	5,1	0,0230	**0,0322**	0,316 g =0,241%	11,15	0,0502	**0,0713**	0,0246	0,0637	**0,0391**
12	„	140	120	600	1,6	0,0072	**0,0084**	5,1	0,0230	**0,0268**	0,567 g =0,405%	8,9	0,0401	**0,0467**	0,0184	0,0383	**0,0199**
13	„	130	120	500	0,9	0,0041	**0,0057**	2,75	0,0124	**0,0174**	0,416 g =0,320%	6,45	0,0290	**0,0406**	0,0117	0,0349	**0,0232**
14	„	105	120	400	1,7	0,0077	**0,0135**	4,4	0,0198	**0,0347**	0,132 g =0,126%	9,2	0,0414	**0,0725**	0,0212	0,0590	**0,0378**

doch soll auf letztere in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden, da weitere Vergleichsbestimmungen zwischen Milchsäurebildung und Zuckerabnahme während der Glykolyse den Gegenstand einer besonderen Untersuchung im hiesigen Institut bilden.

In der Tabelle II geht aus der Kolonne 3 die für jeden Einzelversuch verwendete Menge gewaschener Blutkörperchen hervor. Kolonne 5 gibt an, wie viel von dem entquecksilberten Filtrat jeweils für die Milchsäurebestimmung verwendet wurde. Hierbei sei erwähnt, daß der hohe Eiweißgehalt der Blutkörperchen es notwendig machte, auch in diesen Versuchen statt des zweifachen Volumens Salzsäure und Quecksilberchlorid das $2^1/_2$fache Volumen zu verwenden, so daß die aliquoten, gemessenen Filtratmengen in Kolonne 5 einer 7fachen Blutkörperchenverdünnung entsprechen.

Die Einengung der Filtrate geschah stets bei ganz schwach saurer Reaktion im Vakuum bei einer 40 bis 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers. Im übrigen erfolgte die Ätherextraktion bei phosphorsaurer Reaktion ganz in der früher beschriebenen Weise.

Die erste Extraktion im Lindschen Apparat dauerte mindestens 40 Stunden. Ich habe mich stets durch eine zweite, langdauernde Extraktion, die ganz wie die erste weiter verarbeitet wurde, überzeugt, ob die erste Extraktion vollständig war, und will erwähnen, daß ich nur ausnahmsweise in der zweiten Extraktion sehr geringfügige Mengen Milchsäure fand.

Nach der Filtration des Ätherextraktes und der Entfernung des Äthers durch Destillation unter Wasserzusatz wurde der Extrakt mit Normal-Natronlauge bis zur ganz schwach alkalischen Reaktion versetzt und auf etwa 80 bis 100 ccm aufgefüllt.

Nunmehr wurde die Flüssigkeit zur Verjagung der letzten Alkoholspuren auf dem Wasserbade bis auf etwa 5 bis 6 ccm eingedampft und der Milchsäurebestimmung nach von Fürth und Charnaß unterworfen (siehe oben).

Die Kolonnen 6, 9 und 13 geben die Anzahl ccm $^n/_{10}$-Jodlösung an, die in den Bestimmungen A, B_1 und B_2 gebunden wurden, die Kolonnen 7, 10 und 14 die daraus berechneten Milchsäuremengen in g, während in den fettgedruckten Kolonnen

8, 11 und 15 diese Milchsäurewerte auf 100 ccm Blutkörperchen A, B_1 und B_2 umgerechnet sind.

Wir betrachten zunächst die Versuche 5 bis 9, in denen A-Bestimmungen nicht ausgeführt wurden. Aus einem Vergleich der Kolonnen 11 und 15 geht hervor, daß ausnahmslos die Milchsäurewerte in der Blutkörperchenportion B_2, die unter Zuckerzusatz bei 40° stehen blieb, ganz beträchtlich höher sind, als die entsprechenden Werte für das ohne Zucker angesetzte B_1.

Ganz das gleiche ist auch bei den Versuchen 10 bis 14 der Fall.

Aus Kolonne 18 ist ersichtlich, wieviel Milchsäure in 100 ccm Blutkörperchen B_2 mehr vorhanden war, als in 100 ccm Blutkörperchen B_1. Dieses durch den Traubenzuckerzusatz bedingte Mehr an Milchsäure schwankt zwischen 0,0086 g in Versuch 5 und 0,0402 g in Versuch 10.

Es kann sonach gar keinem Zweifel unterliegen, daß der Zuckerzusatz zu den Blutkörperchen die Menge der beim Stehen gebildeten Milchsäure im Sinne einer häufig ganz gewaltigen Steigerung beeinflußt.

Deutlicher noch, als durch einen bloßen Vergleich der für B_1 und B_2 gewonnenen Werte zeigt sich diese Tatsache, wenn man auch die Milchsäurebestimmungen in A mitberücksichtigt. Man sieht zunächst in den Versuchen 10 bis 14 (Kolonne 8), daß der Milchsäuregehalt der Blutkörperchen A ganz erheblich geringer ist, als derjenige der Blutkörperchen B_1 und natürlich noch viel geringer als derjenige der Blutkörperchen B_2. In den Kolonnen 16 und 17 ist berechnet, wie groß die Milchsäurezunahme in 100 ccm Blutkörperchen B_1 und B_2 gegen 100 ccm Blutkörperchen A ist. In allen Fällen ist die Milchsäurebildung in den Blutkörperchen B_2 um mehr als 100 % größer als diejenige in B_1.

Ein gesetzmäßiger Einfluß der Größe des Zuckerzusatzes zu B_2 (Tabelle II, Kolonne 12) ist nicht mit Deutlichkeit erkennbar.

Dies darf schon deswegen nicht wundernehmen, weil, wie aus meinen Bestimmungen hervorgeht, der Zuckergehalt der Blutkörperchen A ein außerordentlich wechselnder war. In einem Teile der Fälle war der, mittels verschiedener Reduktions-

methoden (Maquenne, Tachau) in den Blutkörperchen A bestimmbare Zucker durch das mehrmalige Waschen mit Kochsalzlösung bis auf Spuren beseitigt. In anderen Fällen waren immerhin noch bestimmbare Mengen vorhanden.

Ich will ausdrücklich hervorheben, daß auch in denjenigen Fällen, in denen sich Traubenzucker in den Blutkörperchen A nur in Spuren fand, die Milchsäurebildung in B_1 nicht ausblieb. Von vornherein wäre es nicht undenkbar, daß hier die Milchsäure aus einer anderen Quelle als Kohlenhydrat gebildet würde, analog den in mehreren voranstehenden Arbeiten am Muskelpreßsaft beobachteten Tatsachen. Jedoch möchte ich eher glauben, daß die Milchsäurebildung in diesen Versuchen auf ein mittels der von mir angewandten Methoden nicht bestimmbares Kohlenhydrat der Blutkörperchen zurückzuführen war.

Wissen wir doch aus älteren und neueren Untersuchungen, daß offenbar im Blute neben dem Traubenzucker Kohlenhydrate, anscheinend polysaccharidartiger Natur, vorkommen, die unter geeigneten Bedingungen Traubenzucker abspalten.

Wie dem aber auch sei, jedenfalls geht aus den eben geschilderten Versuchen hervor, daß Zuckerzusatz die Milchsäurebildung durch gewaschene Blutkörperchen vom Hunde und vom Menschen ganz gewaltig steigert, und es kann nach diesen Untersuchungen, im Zusammenhalt mit den früheren Leberdurchblutungsversuchen von Embden und Kraus und den voranstehenden Arbeiten von Kraske und Kondo keinem Zweifel unterliegen, daß die Milchsäurebildung im Blute auf Kosten von Traubenzucker erfolgt, daß die sogenannte Glykolyse im Blute im wesentlichen nichts anderes ist, als ein Abbau des Zuckers unter Milchsäurebildung.

Die im bisherigen besprochenen Ergebnisse gründeten sich, was die Milchsäurebildung betrifft, ausschließlich auf die mittels der Methode von von Fürth und Charnaß gewonnenen Werte. So zuverlässige Resultate dieser Methode in der im hiesigen Institute üblichen Form, auf reine Milchsäurelösungen angewandt, auch gibt, so notwendig erschien es, die mit diesem immerhin indirekten Verfahren gewonnenen Ergebnisse auf einem mehr direkten Wege nachzuprüfen.

Ich habe diese Prüfung auf zweifache Weise vorgenommen.

Einmal durch Darstellung und nähere Identifizierung reinen Lactats, die ich weiter unten näher zu besprechen haben werde, und zweitens dadurch, da ich, ähnlich wie in der vorangehenden Arbeit von Kondo, in 2 Versuchen (Versuch 12 und 13) neben der Bestimmung nach von Fürth und Charnaß auch die Menge des nach den Angaben von Embden und Kraus aus dem Ätherextrakt über das Bleisalz darstellbaren Zinksalzes ermittelte.

Die Kolonnen 2, 5 und 8 der Tabelle III geben die Mengen des aus den Blutkörperchenportionen A, B_1 und B_2 dargestellten Zinksalzes an.

In den Kolonnen 3, 6 und 9 dieser Tabelle ist die Menge wasserfreien Zinklactats angegeben, die sich aus den titrimetrischen Bestimmungen, die mit den gewogenen Zinksalzen vorgenommen wurden, auf Grund der Angaben von Tabelle II, Versuch 12 und 13, berechnet.

Wir beginnen mit der Besprechung von Versuch 12 (Tabelle III). Hier sind aus den sofort verarbeiteten Blutkörperchen A 0,0232 g Zinksalz bei der Wägung erhalten worden; die aus der Titrationsbestimmung berechnete Menge milchsaures Zink beträgt nur 0,0073 g. Hieraus berechnet sich die Menge der Verunreinigung des Zinksalzes aus A zu 0,0159 g. Der prozentuale Gehalt des gewogenen Zinksalzes an milchsaurem Zink beträgt somit in A nur 31,5% (Tabelle III, Kolonne 11).

Ein Blick auf die Kolonnen 7 und 10 lehrt, daß in Versuch 12 B_1 und B_2 die absolute Menge der Verunreinigung im Zinksalz ebensogroß war, wie bei A (0,0155 g und 0,0154 g). Es ist also die Zunahme, die bei der Wägungsbestimmung in Blut B_1 und B_2 beobachtet wurde, ganz ausschließlich bedingt durch eine Zunahme an milchsaurem Zink, während, um es nochmals zu wiederholen, die Menge der verunreinigenden Substanz ganz konstant bleibt.

Daß der prozentische Gehalt des Zinksalzes an milchsaurem Zink in B_1 größer ist als in A, in B_2 größer als in B_1, geht unmittelbar aus dem eben Gesagten hervor. Er beträgt in Versuch 12, Kolonne 11 in B_1 66,7% und in B_2 77,8% gegen den bereits erwähnten Wert von 31,5% für A.

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12		13	
Nummer	A (sofort verarbeitete Blutkörperchen)			B_1 (nach zweistündigem Stehen ohne Zuckerzusatz verarbeitete Blutkörperchen)			B_2 (nach 2stündigem Stehen mit Traubenzucker verarbeitete Blutkörperchen)			Prozentischer Gehalt des gewogenen Zinksalzes an Zinklaktat			Zunahme an milchsaurem Zink in B_1 auf Grund der		Zunahme an milchsaurem Zink in B_2 auf Grund der	
	Gewogene Menge Zinksalz g	Aus der Titrationsbestimmung berechnete Menge milchsaures Zink g	Demnach betrug die Menge der Verunreinigung im Zinksalz g	Gewogene Menge Zinksalz g	Aus der Titrationsbestimmung berechnete Menge milchsaures Zink g	Demnach betrug die Menge der Verunreinigung im Zinksalz g	Gewogene Menge Zinksalz g	Aus der Titrationsbestimmung berechnete Menge milchsaures Zink g	Demnach betrug die Menge der Verunreinigung im Zinksalz g	A	B_1	B_2	Wägung g	Titration g	Wägung g	Titration g
12	0,0232	0,0073	**0,0159**	0,0465	0,0310	**0,0155**	0,0695	0,0541	**0,0154**	31,5	66,7	77,8	0,0233	0,0237	0,0463	0,0468
13	0,0171	0,0055	**0,0116**	0,0292	0,0167	**0,0125**	0,0514	0,0392	**0,0122**	47,4	57,2	76,3	0,0121	0,0112	0,0343	0,0337

In den Kolonnen 12 und 13 (Versuch 12) sind die Zunahmen an milchsaurem Zink in B_1 und B_2 auf Grund der Wägung und der Titration zusammengestellt. Nach der eben hervorgehobenen Tatsache, daß die Menge der Verunreinigung in allen 3 Fällen praktisch konstant bleibt, ist es selbstverständlich, daß die nach der Wägungs- und nach der Titrationsmethode ermittelten Zunahmen praktisch nicht voneinander abweichen.

In Versuch 13 (Tabelle III) liegen die Verhältnisse ganz ähnlich. Auch hier ist die als Differenz zwischen der Wägungs- und der titrimetrischen Bestimmnng ermittelte Menge der Verunreinigung in A, B_1 und B_2 praktisch gleich. (Der größte Unterschied beträgt weniger als 1 mg.)

Dieses Ergebnis stimmt völlig mit zwei in der vorangehenden Arbeit von Kondo erhobenen Befunden überein, nur daß in meinen Versuchen, wo es sich jedesmal um 3 Einzelbestimmungen mit verschieden großem Milchsäuregehalt nebeneinander handelt, noch schlagender als in denen von Kondo, der jedesmal nur 2 Einzelversuche vornahm, erwiesen wird, daß die durch Wägung ermittelte Zunahme des Zinksalzes ausschließlich eine Zunahme an milchsaurem Zink ist. Die sehr weitgehende Übereinstimmung der durch Wägung und durch Titration ermittelten Zunahmen an Milchsäure wirft jedenfalls ein sehr günstiges Licht auf die von mir angewendete Methodik und läßt es durchaus statthaft erscheinen, die Milchsäurezunahmen beim Stehen des Blutes unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen entweder nur mittels Wägung oder nur mittels Titration zu bestimmen.

Wie bereits oben erwähnt, habe ich außerdem die durch die Blutkörperchen aus Traubenzucker gebildete Milchsäure in Form ihres Zinksalzes rein dargestellt. Ich habe dabei zunächst in der im hiesigen Institut üblichen Weise die Lösung des milchsauren Zinks gewonnen, bis zur eben beginnenden Krystallisation eingeengt und mit etwa dem doppelten Volumen Alkohol versetzt.

Bei mehrtägigem Stehen im Eisschrank schied sich ein sehr reichlicher krystallinischer Niederschlag aus, der auf der Nutsche filtriert, mit Alkohol gewaschen und auf dem Tonteller getrocknet wurde. Ohne weitere Reinigung wurde die

gewonnene Substanz zunächst zu einer Krystallwasserbestimmung benutzt.

Nach einstündigem Stehen bei 110° hatten 0,4283 g Substanz 0,0546 g Wasser verloren. Das weitere Stehen bei 110° veränderte das Gewicht der Substanz nicht mehr.

Berechnet für d-milchsaures Zink . . . 12,89 °/₀ H_2O
Gefunden . . . . 12,75 °/₀

Nunmehr wurde das Zinksalz auf sein optisches Verhalten untersucht.

0,3737 g wasserfreien Zinksalzes wurden in Wasser gelöst, in ein Meßkölbchen von 25 ccm übergespült und bis zur Marke aufgefüllt. Die so gewonnene Lösung wurde im Zwei-Dezimeterrohr unter Benutzung eines dreiteiligen Apparates nach Landolt polarisiert.

Die beobachtete Drehung betrug im Mittel aus einer größeren Anzahl von Ablesungen — 0,28° bei 20,2°. Möglicher Fehler ± 0,01°. Hieraus berechnet ist $[\alpha]_D = -9,37°$.

Die Lösung wurde nach der polarimetrischen Untersuchung wiederum bis zur beginnenden Krystallisation eingeengt, nach dem Verdunsten bis zur Trockene wurde die Hauptmenge der gewonnenen rein krystallinischen Substanz im Platintiegel bei 110 bis 115° getrocknet.

Die Substanz wurde vorsichtig verascht und auf dem Bunsenbrenner bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Hierbei lieferten 0,3340 g Substanz 0,1118 g ZnO.

Berechnet für $(CH_3CHOHCOO)_2Zn$ 33,34 ZnO
Gefunden . . . . 33,47 ZnO.

Aus der Krystallwasser- und Zinkbestimmung der von mir ohne Umkrystallisieren gewonnenen Substanz geht mit Sicherheit hervor, daß es sich um milchsaures Zink handelte. Die Krystallwasserbestimmung im Verein mit der polarimetrischen Untersuchung läßt keinen Zweifel darüber, das das milchsaure Zink ausschließlich die natürliche Rechtsmilchsäure, deren Salze in ihren Lösungen bekanntlich linksdrehend sind, enthielt.

Bei der Glykolyse im Blute wird also, geradeso wie bei der Durchblutung der glykogenfreien Leber, zugesetzter Trauben-

zucker in Milchsäure, und zwar in die natürliche Rechtsmilchsäure verwandelt.

Dieser letztere Punkt ist von besonderer Wichtigkeit im Hinblick auf die in der folgenden Arbeit von Embden, Baldes und Schmitz mitgeteilten Befunde.

Das wesentlichste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß gewaschene Blutkörperchen vom Menschen und vom Hunde zugesetzten Traubenzucker in Milchsäure umwandeln. Die gebildete Milchsäure ist, ihrer optischen Beschaffenheit nach, reine Rechtsmilchsäure.

Im Zusammenhalt mit der früheren Arbeit von H. Fries und den voranstehenden von B. Kraske und Kura Kondo darf es somit als erwiesen gelten, daß das Wesen der von Lépine zuerst beschriebenen Glykolyse nichts anderes ist als eine Umwandlung des im Blute vorhandenen Traubenzuckers in Rechtsmilchsäure.

Über den Chemismus der Milchsäurebildung aus Traubenzucker im Tierkörper.

Von

G. Embden, K. Baldes und E. Schmitz.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In mehreren der voranstehenden Arbeiten wurde gezeigt, daß sowohl bei der künstlichen Durchblutung der Leber als auch bei der sogenannten Glykolyse im Blute Milchsäure aus Traubenzucker gebildet wird.

Wir gelangten hierbei zu der Vorstellung, daß Milchsäure ein auf dem Hauptwege des Traubenzuckerabbaus gelegenes Produkt sei.

Es ergab sich nunmehr die Aufgabe, den Chemismus der Umwandlung von Traubenzucker in Milchsäure näher aufzuklären.

Die Tatsache, daß der Traubenzucker ein Skelett von 6, die Milchsäure hingegen ein solches von 3 Kohlenstoffatomen besitzt, läßt die Annahme notwendig erscheinen, daß die Milchsäurebildung mit einer Spaltung des Traubenzuckermoleküls in seiner Mitte verknüpft ist.

Über die bei der Bildung von Milchsäure aus Traubenzucker im tierischen Organismus etwa intermediär auftretenden Substanzen mit 3 Kohlenstoffatomen liegen eingehender begründete Vorstellungen bisher kaum vor.

Dagegen sind derartige Vorstellungen entwickelt für den Hergang der bakteriellen Milchsäuregärung und namentlich für die alkoholische Gärung durch Hefe, bei der nach einer öfters ausgesprochenen Anschauung der Traubenzucker auf dem Wege über Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure umgewandelt werden sollte.

Die Verschiebungen in der Bindung von Wasserstoff- und Sauerstoffatomen, die bei der Verwandlung von Traubenzucker in Milchsäure eintreten müssen, haben sich verschiedene Forscher sehr verschieden vorgestellt und namentlich ihren Eintritt in sehr verschiedene Stadien des Abbaues verlegt.

So nimmt Baeyer[1]) an, daß, noch während die Kette von 6 Kohlenstoffatomen erhalten ist, eine Akkumulation der Sauerstoffatome nach der Mitte zu erfolgt, die zunächst zur Umwandlung des Hydrates des Traubenzuckermoleküls in die Verbindung

$$\underset{1}{CH_3}\underset{2}{C(OH)_2}\underset{3}{C(OH)_2}\underset{4}{C(OH)_2}\underset{5}{CHOH}\underset{6}{CH_3}$$

führt, die unter Austritt zweier Wassermoleküle sowie unter Sprengung der Kohlenstoffkette in der Mitte bei gleichzeitiger Wanderung des einen an das Kohlenstoffatom 2 gebundenen Hydroxylsauerstoffes zwischen die beiden mittleren Kohlenstoffatome in das Anhydrid der Milchsäure

$$CH_3CHOHCO \underset{O}{\diagdown\diagup} COCHOHCH_3$$

umgewandelt wird, das dann wieder unter Aufnahme eines Wassermoleküls in Milchsäure zerfallen kann.

Eine bekannten chemischen Reaktionsvorgängen mehr entsprechende Umwandlungsart des Traubenzuckers in Milchsäure und Alkohol bei der alkoholischen Gärung nimmt A. Wohl[2]) an.

Unter dem die Bindung zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff am Kohlenstoffatom 2 lockernden Einfluß der mit diesem Kohlenstoffatom verbundenen Carbonylgruppe tritt ein mit dem Kohlenstoffatom 2 verbundenes Wasserstoffatom zusammen mit einer Hydroxylgruppe des benachbarten Kohlenstoffatoms 3 aus.

Hierdurch entsteht aus dem Traubenzucker (I) die mit II bezeichnete Verbindung.

	I	II	III	IV
1	$C{\lt}^{O}_{H}$	$C{\lt}^{O}_{H}$	$C{\lt}^{O}_{H}$	$C{\lt}^{O}_{H}$
2	CHOH	COH	CO	CO
3	CHOH	CH (‖ mit 2)	CH_2	CH_3
4	CHOH	CHOH	CHOH	$C{\lt}^{O}_{H}$
5	CHOH	CHOH	CHOH	CHOH
6	CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH

[1]) A. Baeyer, Über die Wasserentziehung und ihre Bedeutung für das Pflanzenleben und die alkoholische Gärung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 3, 74, 1870.

[2]) A. Wohl, Die neueren Ansichten über den chemischen Verlauf der Gärung. Diese Zeitschr. 5, 45, 1907.

Durch Umlagerung der in II vorhandenen Enolform in die Ketoform entsteht das Formelbild III. Diese Formel stellt nach Wohl eine Verbindung dar, die „durch Aldolkondensation aus Glycerinaldehyd und Methylglyoxal sich aufbauen würde, und wir wissen, daß die durch solche Aldolkondensation entstehenden Produkte erfahrungsgemäß leicht und gerade auch unter den Bedingungen, die die Kondensation herbeiführen, an der Stelle der Aneinanderfügung wieder hydrolytisch sich spalten." (Wohl, l. c., S. 54.)

Darnach also würde die Verbindung III in ein Molekül Methylglyoxal und ein Molekül Glycerinaldehyd zerfallen (IV).

Das Methylglyoxal geht nach Wohl als Verbindung mit der Gruppe $C{=}O\,C\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{smallmatrix}$ in alkalischer Lösung leicht in die entsprechende Oxysäure, das heißt also in α-Milchsäure über. Der bei der Spaltung primär gebildete Glycerinaldehyd soll zunächst wieder unter dem reaktiven Einfluß der Carbonylgruppe in ähnlicher Weise Wasser abspalten, wie es für die Kohlenstoffatome 2 und 3 des Traubenzuckers eben besprochen wurde, und wiederum unter Umlagerung der Enolform in die Ketoform in Methylglyoxal übergehen.

Nach Wohl erfolgt also die Verschiebung der Wasserstoff- und Sauerstoffatome, die zur schließlichen Umwandlung in Milchsäure notwendig ist, an der einen Hälfte des Traubenzuckermoleküls im wesentlichen bereits vor der Spaltung der Kohlenstoffkette, an der anderen Hälfte nachher.

Besonders sei nochmals hervorgehoben, daß Wohl Glycerinaldehyd als intermediäres Produkt bei der Milchsäurebildung aus Traubenzucker ansieht und daß nach ihm die Umwandlung des Glycerinaldehydes in Milchsäure auf dem Umwege über Methylglyoxal erfolgen soll.

Die Möglichkeit des Auftretens von Glycerinaldehyd und auch von Dioxyaceton beim vitalen Abbau der Kohlenhydrate ist auch unabhängig von der Frage der Milchsäurebildung des öfteren ins Auge gefaßt worden.

Wir erwähnen hier nur die verschiedenen Versuche, Dioxyaceton und Glycerinaldehyd zur Vergärung zu bringen.

Die Vergärbarkeit des Dioxyacetons wurde zuerst durch G. Bertrand[1]) einwandsfrei festgestellt, die des Glycerinaldehyds durch E. Buchner und Meisenheimer[2]), während für die aus einem Gemenge beider Substanzen bestehende Glycerose die Vergärbarkeit durch ältere Versuche von J. van Deen, sowie durch neuere von Grimaux, sowie E. Fischer und Tafel dargetan wurde.

---

[1]) G. Bertrand, La Bactérie du sorbose. Annales de Chimie et de Physique (8) 3, 253, 1904.

[2]) Buchner und Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 1778, 1910. (Siehe daselbst auch die frühere Literatur über diesen Gegenstand.)

Buchner und Meisenheimer (l. c.) fanden, daß Dioxyaceton durch Hefe erheblich besser vergoren wird, als Glycerinaldehyd.

Die Anschauung, daß bei der alkoholischen Gärung Milchsäure intermediär auftritt, die gerade auf Grund ihrer eigenen Versuche über Milchsäurebildung im Hefepreßsaft zeitweilig so wahrscheinlich erschienen war, halten Buchner und Meisenheimer, nachdem sie neuerlich die Unangreifbarkeit fertig gebildeter Milchsäure durch lebende Hefe feststellten, nicht mehr aufrecht.

Auf ihre Untersuchungen werden wir an verschiedenen Stellen zurückzukommen haben.

Die im folgenden zu schildernden Versuche, in denen wir uns die Aufgabe setzten, den Chemismus der Milchsäurebildung aus Traubenzucker im Tierkörper näher aufzuklären, erstreckten sich auf die beiden Triosen, den Glycerinaldehyd in seiner bisher ausschließlich zugänglichen Racemform und das Dioxyaceton.

Die Darstellung des Glycerinaldehyds geschah nach der Methode von A. Wohl und C. Neuberg[1]), diejenige des Dioxyacetons nach G. Bertrand[2]).

Herrn Wohl sind wir für die freundliche Überlassung von Impfkrystallen von Glycerinaldehyd, Herrn Bertrand für die freundliche Übersendung von Dioxyacetonkrystallen und einer Kultur des Sorbosebakteriums zu besonderem Danke verpflichtet.

Unsere Glycerinaldehyd- und Dioxyacetonpräparate hatten ganz die von Wohl bezüglich von Bertrand geschilderten Eigenschaften.

Die Untersuchungen wurden zum Teil, wie in der vorangehenden Arbeit von C. von Noorden, an gewaschenen Blutkörperchen vom Hunde und auch von Menschen angestellt, zum Teil an der künstlich durchbluteten glykogenarmen Leber.

Wir beschreiben zunächst die Versuche mit gewaschenen Blutkörperchen, deren Gewinnung in genau der gleichen Weise erfolgte, wie es in der eben erwähnten Arbeit von C. von Noorden geschildert wurde.

Ein gemessener Teil der Blutkörperchen wurde sofort nach Schenck enteiweißt und zu einer Milchsäurebestimmung A_1

---

1) A. Wohl, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 1797, 1898. — Wohl und Neuberg, ebenda **33**, 3095, 1900.

2) G. Bertrand, La Bactérie du sorbose. Annales de Chimie et de Physique (8) **3**, 253, 1904.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nr. des Versuchs	Dauer des Aufenthaltes der Blutkörperchen bei 40° Min.	Für jede Milchsäurebestimmung verwandte Filtratmenge	Gefundene Menge Milchsäure in Gramm und Prozenten der Blutkörperchen						In 100 ccm Blutkörperchen B_2 (mit Traubenzucker)	In 100 ccm Blutkörperchen B_3 (mit Glycerinaldehyd)	In 100 ccm Blutkörperchen B_4 (mit Dioxyaceton)	Bemerkungen
			A_1 (sofort, ohne Zusatz)	A_2 (sofort, mit Zusatz)	B_1 (nach dem Stehen ohne Zusatz)	B_2 (nach dem Stehen mit Traubenzucker)	B_3 (nach dem Stehen mit Glycerinaldehyd)	B_4 (nach dem Stehen mit Dioxyaceton)	mehr als in 100 ccm B_1 gefundene Milchsäuremenge			
1	120	500 ccm 7,25:1	0,0194 g 0,028 %	0,0242 g 0,035 %	0,0345 g 0,050 %	—	0,0936 g 0,136 %	—	—	0,086	—	Glycerinaldehydzusatz zu A_2 und B_3 = 0,4 g
2	120	500 ccm 7,0:1	0,0068 g 0,0095 %	0,0095 g 0,0133 %	0,0234 g 0,0328 %	0,0518 g 0,0725 %	0,0956 g 0,133 %	—	0,040	0,101	—	Glycerinaldehydzusatz zu A_2 und B_3 = 0,4 g Traubenzuckerzusatz zu B_2 = 0,4 g
3	60	500 ccm 7,0:1	0,0169 g 0,0237 %	0,0216 g 0,0302 %	0,0245 g 0,0343 %	0,0259 g 0,0363 %	0,0612 g 0,0857 %	—	0,002	0,051	—	Zusätze wie zu Versuch 2
4	60	500 ccm 7,0:1	0,0077 g 0,0108 %	0,0108 g 0,0151 %	0,0180 g 0,0252 %	0,0311 g 0,0435 %	[0,0442 g 0,0619 %]	—	0,018	[0,037]	—	Zusätze wie zu Versuch 2 Die eingeklammerten Werte für B_3 wurden gravimetrisch ermittelt
5	90	500 ccm 7,0:1	0,0036 g 0,0050 %	0,0072 g 0,0101 %	0,0135 g 0,0189 %	0,0218 g 0,0305 %	0,0711 g 0,0995 %	0,0225 g 0,0315 %	0,012	0,081	0,013 [0,008]	Dioxyacetonzusatz je 0,4 g zu A_2 und B_4 Traubenzuckerzusatz zu B_2 = 0,4 g Glycerinaldehydzusatz zu B_3 = 0,4 g
6	60	500 ccm 7,0:1	0,0081 g 0,0113 %	0,0099 g 0,0139 %	0,0167 g 0,0234 %	0,0310 g 0,0434 %	0,0648 g 0,0907 %	0,0202 g 0,0282 %	0,020	0,067	0,005	Dioxyacetonzusatz je 0,4 g zu A_2 und B_4 Traubenzuckerzusatz zu B_2 = 0,4 g Glycerinaldehydzusatz zu B_3 = 0,4 g
7	60	500 ccm 7,0:1	0,0068 g 0,0095 %	0,0158 g 0,0220 %	0,0153 g 0,0214 %	0,0241 g 0,0337 %	0,0761 g 0,1065 %	0,0540 g 0,0756 %	0,012	0,085	0,054	Zusätze wie in Versuch 6 Die Bestimmung A_1 wurde an 400 ccm Filtrat ausgeführt, die Angabe in Kolonne 4 ist auf 500 ccm berechnet
8	90	500 ccm 7,0:1	0,0059 g 0,0083 %	0,0095 g 0,0133 %	0,0131 g 0,0183 %	0,0248 g 0,0347 %	0,0621 g 0,0869 %	0,0302 g 0,0423 %	0,016	0,069	0,024	Zusätze wie in Versuch 6

verwendet, mehrere gleich große Blutkörperchenportionen blieben 60 bis 120 Minuten, zum Teil ohne Zusatz (B_1), zum Teil unter Zusatz einer bestimmten Traubenzuckermenge (B_2) oder einer gleich großen Menge d-l-Glycerinaldehyd (B_3) oder Dioxyaceton (B_4) stehen.

Die bei schwachsaurer Reaktion im Vakuum nach der Entquecksilberung eingeengten gemessenen Filtratanteile wurden in der früher geschilderten Weise bei phosphorsaurer Reaktion im Lindschen Apparat erschöpfend extrahiert. (Stets erfolgten langdauernde Kontrollextraktionen.)

In unseren ersten Versuchen begnügten wir uns damit, die Milchsäure nach der Entfernung des Äthers durch Destillation unter Wasserzusatz und nach Verjagung etwa vorhandener Alkoholspuren durch Einengen der schwach alkalisch gemachten Flüssigkeiten direkt nach dem v. Fürth-Charnaßschen Verfahren zu bestimmen.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle I zusammengestellt.

Für den Glycerinaldehyd zeigen die Versuche dieser Tabelle übereinstimmend, daß er die Milchsäurebildung in gewaschenen Blutkörperchen in ganz außerordentlich hohem Maße steigert. In Versuch 1 wurden in dem zur Bestimmung verwendeten Filtratanteil von Portion B_1, die 2 Stunden ohne Zusatz bei 40° gestanden hatte, 0,0345 g Milchsäure gefunden (Kolonne 6), in einem gleichgroßen Filtratanteil von Portion B_3, die bis auf den Zusatz von 0,4 g Glycerinaldehyd ganz gleich behandelt war, 0,0936 g. In den insgesamt verwendeten 100 ccm Blutkörperchen B_3 wurden 0,086 g Milchsäure mehr gebildet, als in den Blutkörperchen B_1. Der Gesamtbetrag dieser Mehrbildung ist vom Glycerinaldehyd abzuleiten, von dem nach der titrimetrischen Milchsäurebestimmung in diesem Falle erheblich mehr als 20% in Milchsäure übergeführt wurden.

Es ist aber zu bedenken, daß Zusatz von Glycerinaldehyd an sich nicht ohne Einfluß auf die Milchsäurebestimmung nach v. Fürth und und Charnaß ist. In den Versuchen 1 bis 4 haben wir neben dem sofort ohne Zusatz gefällten Blutkörperchenanteil A_1 noch einen gleich großen Anteil A_2 unter Zusatz von 0,4 g Glycerinaldehyd sofort verarbeitet.

In sämtlichen 4 Versuchen ist der für A_2 gefundene Wert etwas höher als der für A_1 erhaltene.

Jedoch beträgt der auf 100 ccm Blutkörperchen berechnete Mehrgehalt an Milchsäure in A_2 im Höchstfalle nur etwa 7 mg, während die beim Stehen der Blutkörperchen mit Glycerinaldehyd auf dessen Kosten erfolgende Milchsäurebildung stets ein Vielfaches von diesem Werte beträgt. Praktisch kommt also der der titrimetrischen Methode bei Anwesenheit von Glycerinaldehyd anhaftende Fehler für unsere Versuche nicht in Betracht.

Ganz ähnlich, wie Versuch 1, verliefen auch die übrigen Versuche. Im Versuch 2 betrug nach zweistündigem Stehen die Mehrbildung von Milchsäure im Glycerinaldehydversuch gegenüber dem Leerversuch pro 100 ccm Blutkörperchen (Kolonne 11) 101 mg, die durch einen gleich großen Traubenzuckerzusatz hervorgerufene Mehrbildung nur 40 mg.

Glycerinaldehyd bildete in diesem Versuche also weit stärker Milchsäure als Traubenzucker.

Auch diese Tatsache wird von den Versuchen 3 bis 8 durchaus bestätigt. In Versuch 3 war nach einstündigem Stehen bei 40° eine Mehrbildung von Milchsäure unter dem Einfluß von Traubenzuckerzusatz nur angedeutet, der Glycerinaldehydversuch zeigt gegenüber dem Leerversuch eine Steigerung von 51 mg.

In Versuch 4 wurde für die Portion mit Glycerinaldehydzusatz der Milchsäuregehalt durch Wägung des wasserfreien Zinksalzes ermittelt. Die Steigerung der Milchsäurebildung durch Traubenzucker beträgt hier 18 mg, die durch Glycerinaldehyd 37 mg pro 100 ccm Blutkörperchen. Nach eineinhalbstündigem Stehen sind die entsprechenden Werte in Versuch 5 für den Traubenzuckerversuch 12 mg, für den Glycerinaldehyd 81 mg.

In den Versuchen 5 bis 8 wurde auch die Einwirkung des Dioxyacetons auf die Milchbildung in gewaschenen Blutkörperchen an der Hand der titrimetrischen Methode untersucht.

Auch hier erfolgt eine Mehrbildung von Milchsäure, die in Versuch 5 nach der titrimetrischen Methode etwa ebenso groß, wie die durch Traubenzuckerzusatz hervorgerufene ist, also weitaus kleiner, als die durch Glycerinaldehydzusatz bedingte.

In Versuch 6 steht einer Milchsäurebildung von 12 mg pro 100 ccm Blutkörperchen im Leerversuch im Traubenzuckerversuch eine solche von 32 mg, im Versuch mit Glycerinaldehyd von 79 mg, im Versuch mit Dioxyaceton von 14,4 mg gegenüber. Der Dioxyacetonzusatz hat also gegenüber dem

Leerversuch eine geringe Steigerung der Milchsäureproduktion herbeigeführt, die gegenüber der durch Glycerinaldehydzusatz herbeigeführten Steigerung verschwindend klein ist.

Hierbei ist noch zu bedenken, daß die Anwesenheit von Dioxyaceton ebenso wie diejenige von Glycerinaldehyd die titrimetrisch ermittelten Werte etwas zu hoch erscheinen läßt, wie aus einem Vergleich der Kolonnen 4 und 5 der Versuche 5 bis 8 hervorgeht, in denen die Bestimmung A_2 unter Zusatz von 0,4 g Dioxyaceton erfolgte.

Unter Berücksichtigung dieses Fehlers ist auch in Versuch 5 die Milchsäurebildung aus Dioxyaceton merklich geringer als die aus Traubenzucker, während Glycerinaldehyd über sechsmal so viel Milchsäure bildete als Traubenzucker.

Etwas abweichend ist das Verhalten im Versuch 7, wo die Milchsäurebildung aus Dioxyaceton über viermal so groß ist als die aus Traubenzucker. Aber auch hier wird sie noch ganz erheblich durch die Milchsäurebildung aus Glycerinaldehyd übertroffen (aus Dioxyaceton pro 100 ccm Blutkörperchen gebildete Milchsäuremenge 0,0542 g, aus Glycerinaldehyd pro 100 ccm Blutkörperchen gebildete Milchsäuremenge 0,0851 g).

Wodurch der hohe Wert im Dioxyacetonversuch in diesem Falle bedingt war, vermögen wir nicht zu sagen. Es ist nicht ganz ausgeschlossen, daß sich aus Dioxyaceton unter der Einwirkung von Blutkörperchen geringe Mengen einer Säure bilden, die nicht Milchsäure ist, aber bei der Oxydation flüchtige bisulfitbindende Produkte liefert. Wenigstens ist in den Dioxyacetonversuchen an Blutkörperchen das schließlich gewonnene Zinksalz weitaus schwerer als in den Traubenzucker- und Glycerinaldehydversuchen zur Krystallisation zu bringen.

Das Ergebnis des Versuchs 8 steht etwa in der Mitte zwischen dem des Versuchs 7 und den in den Versuchen 5 und 6 gewonnenen Resultaten.

Die titrimetrisch ermittelte Menge aus Dioxyaceton gebildeter Milchsäure (Kolonne 12) ist hier etwas größer als die aus Traubenzucker (Kolonne 10), beträgt hingegen nur etwas mehr als ein Drittel der Milchsäurebildung aus Glycerinaldehyd (Kolonne 11).

Nach dem Ergebnis der Versuche 5 bis 8 kann es keinem Zweifel unterliegen, daß Glycerinaldehyd weitaus stärker als

Dioxyaceton auf den Umfang der Milchsäurebildung einwirkt. Ja, in mehreren der Versuche war bei außerordentlich starker Milchsäurebildung aus Glycerinaldehyd diejenige aus Dioxyaceton nur eben erkennbar.

Daß der Glycerinaldehyd ungleich leichter als das Dioxyaceton durch Blutkörperchen angegriffen wird, kann man leicht an der Hand einer einfachen qualitativen Reaktion zeigen. Beide Substanzen haben bekanntlich bereits in der Kälte stark reduzierende Eigenschaften. Sie reduzieren u. a. — wie wir feststellten — Quecksilberoxyd bei Gegenwart einer genügenden Menge freien Alkalis in der Kälte zu Quecksilber.

Die nach Schenck gewonnenen Blutkörperchenfiltrate zeigen daher, falls sie erhebliche Mengen Glycerinaldehyd oder Dioxyaceton enthalten (speziell auch auch bei dem Gehalt, wie er in den Versuchen A_2 vorhanden war) nach Zusatz einer ausreichenden Menge Natronlauge eine rasch eintretende Schwärzung.

In einem genau in der gleichen Weise wie Versuch 5 angestellten Versuche trat nach Zusatz einer bestimmten Menge Natronlauge zu einer bestimmten Filtratmenge in B_4 (zweistündiges Stehen mit Dioxyaceton) sehr rasch intensive Schwärzung ein, während in B_3 (zweistündiges Stehen mit Glycerinaldehyd) die Reaktion nur sehr langsam und schwach auftrat. Offenbar war hier die Hauptmenge des Dioxyacetons noch vorhanden, die Hauptmenge Glycerinaldehyd verschwunden.

Es mußte unsere nächste Aufgabe sein, die aus Glycerinaldehyd und aus Dioxyaceton gebildete Milchsäure in exakterer Weise, als es durch das indirekte Verfahren nach v. Fürth und Charnaß möglich ist, als solche zu identifizieren und Aufschluß über ihre optische Natur zu gewinnen.

War doch sowohl bei der Durchblutung der Leber, wie auch bei der Glykolyse im Blute stets nur d-Milchsäure aufgetreten und konnten doch dementsprechend als Zwischenprodukt dieser vitalen Reaktion ebenfalls nur d-Milchsäure bildende Substanzen in Betracht kommen.

Wir besprechen zunächst die Isolierung und nähere Identifizierung der Milchsäure aus Glycerinaldehyd.

In einem in ganz ähnlicher Weise wie die bisher geschilderten — nur mit größeren Mengen — unter Glycerinaldehydzusatz angestellten Versuch wurde die Milchsäure in der mehrfach beschriebenen Weise über das Bleisalz in das Zinksalz übergeführt. Das Zinksalz krystallisierte sehr vollständig. Es wurde ohne weitere Reinigung in Lösung gebracht und polarimetrisch untersucht.

Die Lösung zeigte sehr deutliche Rechtsdrehung, drehte also im Sinne der unnatürlichen l-Milchsäure.

Unser nächster Gedanke war, daß diese Drehung hervorgerufen wurde durch irgendeine optisch aktive Verunreinigung.

Das war aber keineswegs der Fall, wie aus einer Reihe weiterer Versuche hervorgeht. Es gelang leicht, durch fraktionierte Krystallisation das Zinksalz in eine schwerer lösliche, optisch inaktive Fraktion und in eine leichter lösliche, rechtsdrehende Fraktion zu zerlegen, aus der durch Alkoholfällung annähernd reines, d. h. von d-l-Lactat freies, unnatürliches milchsaures Zink dargestellt werden konnte.

Wir wollen im folgenden die Ausführung eines solchen Versuchs kurz schildern.

In Versuch 9 blieben 100 ccm gewaschene Blutkörperchen mit 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 °/$_0$ ohne weiteren Zusatz 2 Stunden bei 40° stehen. Die aus diesem Versuch titrimetrisch ermittelte Milchsäuremenge betrug für die angewandten 100 ccm Blutkörperchen 0,0248 g.

500 ccm derselben Blutkörperchen blieben mit 500 ccm Kochsalzlösung, in denen 2 g Glycerinaldehyd gelöst waren, ebenfalls zwei Stunden bei 40°. Von dem siebenfach verdünnten Filtrat wurden nach der Entquecksilberung mit Schwefelwasserstoff 2600 ccm weiterverarbeitet.

Die Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffes durch einen Luftstrom gelingt nur unvollkommen, was anscheinend daran liegt, daß der Schwefelwasserstoff mit dem Glycerinaldehyd eine Additionsverbindung bildet.

Nach dem Einengen der genannten Filtratmenge bei schwach saurer Reaktion und einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers im Vakuum wurde die Flüssigkeit in üblicher Weise bei phosphorsaurer Reaktion im Lindschen Apparat extrahiert.

Nach dem Abdestillieren des Äthers unter Wasserzusatz wurde die sehr stark sauer reagierende Flüssigkeit mit reinem Bleicarbonat auf dem Wasserbad erwärmt, wobei allmählich zunehmende Schwärzung des Bleicarbonats — offenbar durch Sulfidbildung — eintrat

Die Lösung des Bleisalzes wurde nach dem Abkühlen unter Nachwaschen mit kaltem Wasser filtriert und das gewonnene

farblose Filtrat mit Schwefelsäure in geringem Überschusse versetzt. Nach der Entfernung des Bleisulfats durch Filtration wurden 15 ccm starker Phosphorsäurelösung hinzugefügt und wieder erschöpfend im Lindschen Apparat extrahiert.

Dieses zweite Ätherextrakt wurde ganz in der von Embden und Kraus für die Milchsäurebestimmung geschilderten Weise über das Bleisalz in das Zinksalz übergeführt, und die Lösung des Zinksalzes auf dem Wasserbade eingeengt. Die eingeengte Lösung drehte wieder deutlich nach rechts. Sie begann im nicht evakuierten Exsiccator bald in schönen, kreuzweise angeordneten Prismen zu krystallisieren. Am nächsten Morgen wurden die Krystalle abgesaugt und zweimal mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Die rein weißen Krystalle wogen nach völligem Trocknen auf dem Tonteller 0,1270 g.

Die Gesamtmenge der Krystalle wurde bei 112° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Gewicht der krystallwasserfreien Substanz 0,1052 g. Dementsprechend ist der Krystallwassergehalt = 0,0218 g oder = 17,17%. Er nähert sich also dem für gärungsmilchsaures Zink berechneten Krystallwassergehalt von 18,18% weit mehr als dem für aktives milchsaures Zink berechneten von 12,89%. Mit der krystallwasserfreien Substanz wurde eine Zinkbestimmung vorgenommen.

0,1052 g Substanz gaben 0,0348 g ZnO.

ZnO gefunden:	33,08%
berechnet für milchsaures Zink	33,44%.

Es erwies sich also die erste Krystallfraktion ohne weitere Reinigung als reines milchsaures Zink von annäherndem Krystallwassergehalt des d-l-milchsauren Zinks.

In einem weiteren, ganz ähnlich angestellten Versuch wurde die am schwersten lösliche Krystallfraktion, die lufttrocken 0,1404 g wog, polarimetrisch untersucht. Es konnte keinerlei Drehung beobachtet werden. Der Krystallwassergehalt war in diesem Falle um ein weniges geringer als in dem eben geschilderten.

0,1404 g Substanz verloren beim Trocknen bei 110° bis zur Gewichtskonstanz 0,0232 g. Daraus berechneter Krystallwassergehalt 16,52%.

Wichtiger noch als die Identifizierung des schwerer löslichen,

inaktiven Zinksalzes erschien uns die des leichter löslichen, optisch aktiven. Wir haben zu diesem Zwecke die leichter löslichen Krystallfraktionen von drei Versuchen, und zwar von dem eben besprochenen Versuch 9 und 10 und von einem ganz ähnlich angestellten Versuch 11, die alle schön krystallisiert waren, miteinander vereinigt. Das Gesamtgewicht dieser Fraktionen betrug etwa 0,6 g. Die Substanz wurde in wenig Wasser gelöst, die Lösung von einem geringfügigen Niederschlage abfiltriert und bis auf wenige Kubikzentimeter eingeengt. Am nächsten Morgen wurde von der abgeschiedenen Krystallisation abgesaugt.

Die Mutterlauge wurde wieder etwas eingeengt und mit annähernd dem gleichen Volumen Alkohol von 99 % versetzt, wobei die Flüssigkeit zunächst fast klar blieb. Am nächsten Morgen hatte sich nach dem Stehen im Eisschrank eine nicht unbeträchtliche Krystallisation ausgeschieden. Die völlig farblosen Krystalle wurden abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Nach mehrtägigem Stehen auf dem Tonteller an der Luft betrug ihr Gewicht 0,1921 g. Der Gewichtsverlust der Substanz nach dem Trocknen bei 110 bis 117° zur Konstanz beträgt 0,0252 g. Daraus berechneter Krystallwassergehalt = 13,12 %, während sich für aktives milchsaures Zink 12,89 % berechnen.

Die gesamte Substanzmenge wurde nunmehr in Wasser gelöst und die Lösung auf genau 14 ccm aufgefüllt. Bei Anwendung eines dreiteiligen Polarisationsapparates nach Landolt drehte diese Lösung im 2 dcm-Rohr bei etwa 22° 0,23° nach rechts (± 0,01°). Hieraus berechnet sich α_D zu annähernd + 9,6°, ein Wert, der mit der spezifischen Drehung des unnatürlichen milchsauren Zinkes bei der in Frage kommenden Konzentration von etwa 1,2 % übereinstimmen dürfte. Die polarisierte Lösung wurde nun in ein Wägeschälchen übergeführt und wieder zur Krystallisation eingeengt.

0,1335 g wasserfreier Substanz wurden im Platintiegel vorsichtig auf dem Bunsenbrenner verascht und bis zur Gewichtskonstanz geglüht. Sie lieferten 0,0454 g ZnO.

Gefunden:	34,01 % ZnO
Berechnet für wasserfreies milchsaures Zink	33,44 %.

Trotzdem der Zinkgehalt ein klein wenig zu hoch gefunden wurde (der Unterschied im Gewicht des Zinkoxyds gegenüber dem richtigen beträgt weniger als 1 mg), kann es keinem Zweifel unterliegen, daß es sich hier um die unnatürliche Form des milchsauren Zinks, die jedenfalls nur mit sehr geringen Mengen der d-l-Verbindung verunreinigt war, handelte.

Der Glycerinaldehyd war also durch die Blutkörperchen in ein Gemenge von d-l-Milchsäure und l-Milchsäure umgewandelt worden. Die Aktivität der aus Glycerinaldehyd gebildeten Milchsäure erscheint fraglos zu gering, weil, unabhängig vom Glycerinaldehydzusatz, in den Blutkörperchen eine wenn auch nicht sehr erhebliche Bildung von d-Milchsäure erfolgte, die mit einem Teil der aus Glycerinaldehyd gebildeten l-Milchsäure zur Racemform zusammentreten mußte.

Bevor wir in eine weitere Erörterung dieses an den gewaschenen Blutkörperchen gewonnenen Ergebnisses eintreten, wollen wir kurz die Resultate zweier Durchblutungsversuche besprechen, die wir an der durch viertägigen Hunger äußerst glykogenarm gemachten Hundeleber vornahmen. An einer solchen Leber tritt, wie früher ausgeführt wurde, ebensowenig wie an der von Glykogen praktisch völlig befreiten Leber strychninisierter Hunde bei einfacher Durchblutung mit Rinderblut ohne Zusatz eine Milchsäurebildung ein, im Gegenteil meistens eine mehr oder weniger beträchtliche Abnahme der Milchsäure.

In den Versuchen 1 und 2 der Tabelle II wnrde die Leber unter Zusatz von 10 g Glycerinaldehyd währed 60 Minuten durchströmt. An je 1200 ccm Blutfiltrat A (= 200 ccm Blut vor der Durchblutung) wurden Milchsäurebestimmungen in der öfters geschilderten Weise nach v. Fürth und Charnaß vorgenommen.

Der Milchsäuregehalt von 200 ccm Blut A beträgt in Versuch 1 (Tabelle II, Kolonne 4) 0,0513 g, in Versuch 2 in zwei sehr gut miteinander übereinstimmenden, nach der Entquecksilberung des Blutfiltrats getrennt behandelten Parallelbestimmungen nahezu 0,1 g.

Die Verarbeitung des Blutes B geschah in anderer Weise. Eine größere entquecksilberte Filtratmenge (in Versuch 1 5100 ccm, in Versuch 2 5600 ccm) wurde im Vakuum bei

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Nr. des Versuchs	Gewicht d. Leber vor der Durchblutung g	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	In 1200 ccm Filtrat von Blut A gefundene Milchsäure g	In 1200 ccm Filtrat von Blut B gefundene Milchsäure g	Milchsäure in 6000 ccm Blutfiltrat A g	Milchsäure in 6000 ccm Blutfiltrat B g	Mehrgehalt an Milchsäure im Filtrat des Blutes B: pro 6000 ccm Blutfiltrat g	Mehrgehalt an Milchsäure im Filtrat des Blutes B: des Ausgangswertes %	Milchsäure in 1200 ccm Leberfiltrat g	Bemerkungen
1	135	10 g d-l-Glycerinaldehyd in 200 ccm Ringerscher Lösung ohne Traubenzucker	0,0513	mehr als 0,201	0,2565	mehr als 1,005	mehr als 0,7485	mehr als 292	0,3029	Der in Kolonne 10 für 1200 ccm Leberfiltrat angegebene Wert wurde aus dem an 900 ccm Filtrat gravimetrisch ermittelten berechnet.
2	153	10 g d-l-Glycerinaldehyd in 200 ccm Ringerscher Lösung	0,0992 0,0990	mehr als 0,3327	0,4955	mehr als 1,6535	mehr als 1,1580	mehr als 234	0,3546	Der in Kolonne 10 angegebene Wert wurde aus dem an 1000 ccm Filtrat gravimetrisch ermittelten berechnet.
3	120	10 g Dioxyaceton in 200 ccm Ringerscher Lösung	0,0594	0,0927	0,2970	0,4635	0,1665	56	0,2008	Der in Kolonne 10 angegebene Wert wurde aus dem an 700 ccm Filtrat gravimetrisch ermittelten berechnet.

schwach saurer Reaktion und einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers eingeengt und bei phosphorsaurer Reaktion in üblicher Weise erschöpfend mittels des Lindschen Apparates extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Extraktionsäthers unter Wasserzusatz wurde in bekannter Weise über das Bleisalz das Zinksalz dargestellt.

Das Zinksalz krystallisierte in beiden Versuchen bereits beim Einengen auf dem Wasserbade. Die Krystallisation nahm beim Stehen in der Kälte sehr rasch zu. Die Krystalle wurden abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen.

Die gelblich gefärbte Mutterlauge drehte im ersten Versuch, ähnlich dem Verhalten bei den Blutkörperchen, schwach, aber deutlich nach rechts. Im zweiten Versuch konnte eine Drehung nicht festgestellt werden.

Nach nochmaligem Einengen der Mutterlaugen und Zusatz

von etwas Alkohol schieden sich beim Stehen im Eisschrank nicht ganz unerhebliche weitere Krystallmengen ab.

In Versuch 2 wurde an einem aliquoten gemessenen Teil der letzten Mutterlauge schließlich noch eine Milchsäurebestimmung nach v. Fürth und Charnaß vorgenommen.

Aus den in Versuch 1 verarbeiteten 5100 ccm Filtrat wurden 1,4068 g lufttrockenen Zinksalzes gewonnen. Ein Teil der Substanz wurde gelöst und die Lösung polarimetrisch untersucht; sie erwies sich als völlig inaktiv. Durch Krystallwasser- und Zinkbestimmung wurde die Substanz ohne weiteres Umkrystallisieren als d-l-milchsaures Zink identifiziert.

Abgesehen davon, daß hier der Milchsäuregehalt der Mutterlauge nicht mit berücksichtigt wurde, gingen beim Absaugen der Krystalle sicherlich geringe Mengen von Lactat verloren.

In Versuch 1, Kolonne 5 ist der Milchsäuregehalt in 1200 ccm Filtrat B auf Grund der eben angegebenen Ausbeute an krystallwasserhaltigem Zinklactat berechnet. Dieser Wert ist nach dem eben Gesagten sicher zu klein.

In Kolonne 6 und 7 ist der Milchsäuregehalt pro 6000 ccm Blutfiltrat A und B angegeben. Bei A entspricht diese Filtratmenge 1000 ccm Blut, bei B einer geringeren Menge, da das Blut B durch den Zusatz von 200 ccm Ringerscher Lösung zu 1700 ccm Blut und 135 g Leber verdünnt worden war.

Der Mehrgehalt an Milchsäure pro 6000 ccm Blutfiltrat beträgt in B gegenüber A 0,7485 g, die Zunahme der Milchsäure während der Durchblutung in Prozenten des für Blutfiltrat A ermittelten Wertes ist 292, d. h. der Milchsäuregehalt des Blutfiltrates B ist fast viermal so groß, als der des Blutfiltrates A.

In Versuch 2 wurden bei der ersten Ätherextraktion der 5600 ccm Filtrat 2,2444 g krystallwasserhaltiges, gärungsmilchsaures Zink gewonnen, bei einer zweiten Extraktion noch 0,1191 g krystallwasserfreies Salz. In den letzten Mutterlaugen wurden nach dem titrimetrischen Verfahren 0,1080 g Milchsäure gefunden. Hieraus berechnen sich für 1200 ccm Filtrat von Blut B 0,3327 g Milchsäure, für 6000 ccm Filtrat 1,6535 g. Der Mehrgehalt an Milchsäure in 6000 ccm Blutfiltrat B betrug gegenüber der gleichen Filtratmenge von Blut A 1,1580 g. In Prozenten des für A ermittelten Wertes ist die Zunahme

in B bei Versuch 2 wegen des hohen Milchsäuregehaltes von Blut A etwas geringer als in Versuch 1 (234 %).

Die isolierte Milchsäure bestand in Versuch 1 und 2 ausschließlich aus der d-l-Verbindung. Daß aber in beiden Versuchen die Bildung der unnatürlichen Komponente überwog, geht (ganz abgesehen von der schwachen Rechtsdrehung der letzten Mutterlauge in Versuch 1) aus der optischen Inaktivität des isolierten Zinklactats hervor. Denn, auch wenn man annehmen will, daß von der von vornherein im Blut A vorhandenen d-Milchsäure, deren Betrag nicht ganz unerheblich war, während der Durchblutnng ein wesentlicher Teil verschwunden ist, so haben wir doch niemals in Leerversuchen ein völliges Verschwinden der d-Milchsäure beobachtet.

Schon das bloße Fehlen einer optischen Aktivität im Sinne der d-Milchsäure beweist daher ein Überwiegen der Bildung unnatürlicher Milchsäure bei der Durchblutung.

Sowohl durch die Formelemente des Blutes allein, wie auch bei der Durchblutung der glykogenarmen Leber wurde aus Glycerinaldehyd in außerordentlich hohem Maße Milchsäure gebildet.

In beiden Fällen bestand die aus Glycerinaldehyd gebildete Milchsäure aus einem Gemenge der d-l-Form und der l-Form.

In den Blutkörperchenversuchen konnten beide Formen nebeneinander isoliert werden, während in den Durchblutungsversuchen die von vornherein in nicht unerheblicher Menge vorhandene d-Milchsäure ausreichte, die offenbar auch hier in überwiegender Menge gebildete l-Milchsäure vollständig oder nahezu vollständig in die d-l-Form überzuführen. Eine andere, wahrscheinlich vorhandene Ursache für die fehlende Aktivität des aus den Leberdurchblutungsversuchen isolierten Zinklactats wird in einer nachfolgenden Arbeit von Embden, Schmitz und Baldes besprochen werden.

Sowohl bei der Umwandlung des Traubenzuckers in Milchsäure durch Blutkörperchen als auch beim Abbau der Kohlenhydrate in der durchbluteten Leber wird im Gegensatz hierzu ausschließlich Rechtsmilchsäure gebildet, und es erhebt sich nunmehr die Frage, ob trotz der Verschiedenheit im optischen Verhalten der gebildeten Milchsäure Glycerinaldehyd als Zwischenprodukt bei der Umwandlung von Traubenzucker in Milchsäure angesehen werden darf.

Wir möchten diese Frage durchaus bejahend beantworten und glauben, daß sich die eben erwähnte Abweichung im optischen Verhalten auf sehr einfache Weise erklären läßt:

Der zu unseren Versuchen benützte Glycerinaldehyd war die bisher ausschließlich zugängliche d-l-Verbindung. Wir brauchen nur anzunehmen, daß der bei der Spaltung des Traubenzuckermoleküls auftretende Glycerinaldehyd nur aus der *einen* optischen Komponente besteht und daß die optische Aktivität der schließlich auftretenden Milchsäure von dem optischen Verhalten des sich in Milchsäure umlagernden Glycerinaldehyds abhängig ist, um die beobachteten Tatsachen weitgehend zu erklären.

Die beiden eben gemachten Annahmen, daß nämlich der aus Traubenzucker im Tierkörper gebildete Glycerinaldehyd optisch aktiv sein muß und daß seine optische Aktivität das optische Verhalten der aus ihm gebildeten Milchsäure bestimmt, sind durchaus zwingend, wenn überhaupt Glycerinaldehyd als intermediäres Produkt des Traubenzuckerabbaues in Frage kommen soll. Nehmen wir — hypothetisch — das Auftreten von Glycerinaldehyd beim Traubenzuckerabbau als sicherstehende Tatsache an, so *müssen* die beiden eben gemachten Annahmen zutreffen.

Es wäre natürlich sehr erwünscht, die Abhängigkeit der optischen Aktivität der Milchsäure von dem optischen Verhalten des sie bildenden Glycerinaldehyds an aktiven Glycerinaldehydpräparaten darzutun. Über derartige Versuche hoffen wir in nicht zu ferner Zeit berichten zu können.

Betrachtet man die sterische Formel des Traubenzuckers, wie sie von *Emil Fischer* aufgestellt worden ist, so kann man sich dieselbe entstanden denken durch Aldolkondensation zweier Glycerinaldehydmoleküle:

$$
\begin{array}{c}
C{\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{smallmatrix}}\\
|\\
H-C-OH\\
|\\
CH_2OH\\
+\\
C{\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{smallmatrix}}\\
|\\
H-C-OH\\
|\\
CH_2OH
\end{array}
\quad = \quad
\begin{array}{c}
C{\begin{smallmatrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{smallmatrix}}\\
|\\
H-C-OH\\
|\\
HO-C-H\\
|\\
H-C-OH\\
|\\
H-C-OH\\
|\\
CH_2OH
\end{array}
$$

Eine an der Stelle der Aldolkondensation einsetzende Spaltung unter Aufhebung der aldolartigen Bindung würde, wie man ohne weiteres sieht, zu sterisch miteinander identischen Glycerinaldehydmolekülen führen.

Bei der eben erwähnten Spaltungsart des Traubenzuckers, die von vornherein als sehr möglich erscheint, würde also nur die eine der beiden möglichen optischen Komponenten des Glycerinaldehyds gebildet werden.

Wenn die optische Beschaffenheit der gebildeten Milchsäure von der optischen Beschaffenheit des intermediär auftretenden Glycerinaldehyds bestimmt wird, so gewinnen wir damit wichtige Aufschlüsse über den Chemismus, nach dem diese Umwandlung sich vollzieht.

Die optische Beschaffenheit des Glycerinaldehyds kann natürlich nur dann von Einfluß auf das optische Verhalten der aus ihm entstehenden Milchsäure sein, wenn in allen Phasen der Umwandlung das asymmetrische Kohlenstoffatom im Glycerinaldehyd als solches erhalten bleibt.

Dementsprechend kann bei der Umwandlung von Glycerinaldehyd in Milchsäure die sekundäre Alkoholgruppe des Glycerinaldehyds nicht zur Carbonylgruppe oxydiert werden. Es kann also weder Brenztraubensäure, noch, wie Wohl für den Prozeß der alkoholischen Gärung angenommen hat, Methylglyoxal als intermediäres Produkt zwischen Glycerinaldehyd und Milchsäure in Betracht kommen. Ebensowenig kann bei diesem Umwandlungsprozeß eine Reduktion der sekundären Alkoholgruppe zur Methylengruppe eintreten.

Betrachtet man die Formeln für Glycerinaldehyd und für Milchsäure:

Glycerinaldehyd	Milchsäure
1 CH_2OH	1 CH_3
2 $CHOH$	2 $CHOH$
3 $C{\overset{O}{\underset{H}{<}}}$	3 $COOH$

so finden die aus den festgestellten Tatsachen und der Annahme, daß Glycerinaldehyd überhaupt ein intermediäres Produkt des Zuckerabbaues ist, gezogenen Schlußfolgerungen den

einfachsten Ausdruck darin, daß man eine Wanderung des Sauerstoffatoms aus der mit 1 bezeichneten primären Alkoholgruppe des Glycerinaldehyds an die mit 3 bezeichnete Aldehydgruppe annimmt, daß sich also die Aldehydgruppe des Glycerinaldehyds auf Kosten der primären Alkoholgruppe oxydiert. Danach würde die Umwandlung von Glycerinaldehyd in Milchsäure die einfachste und direkteste Form der hier überhaupt denkbaren Umlagerungen darstellen.

Es erscheint auf den ersten Blick auffällig, daß d-l-Glycerinaldehyd nicht reine d-l-Milchsäure, sondern ein Gemenge von d-l-Milchsäure und l-Milchsäure bildet. Folgende Erklärungsmöglichkeiten kommen hauptsächlich hierfür in Betracht.

Entweder spielen sich an der natürlichen Komponente des Glycerinaldehyds neben der Umlagerung zu Milchsäure noch andere Prozesse, z. B. synthetischer Natur, ab, deren die unnatürliche Komponente nicht oder nur in geringerem Maße fähig ist, oder von der gebildeten d-l-Milchsäure wird die natürliche Komponente stärker weiterverbraucht als die unnatürliche. Vielleicht spielen sich auch die beiden eben erwähnten Vorgänge nebeneinander ab.

Das Verhalten des d-l-Glycerinaldehyds erinnert in gewisser Weise an frühere Beobachtungen, die Embden bezüglich des Verhaltens des d-l-Leucins, des natürlichen l-Leucins und des unnatürlichen d-Leucins in der künstlich durchbluteten Leber anstellte.

d-l-Leucin und d-Leucin bilden unter gewissen Versuchsbedingungen sehr viel stärker, als natürliches l-Leucin, Acetessigsäure, was gleichbedeutend damit ist, daß die unnatürliche Komponente des Leucins stärker als die natürliche abgebaut wird. Embden versuchte dieses eigenartige Verhalten durch die Annahme zu erklären, daß natürliches Leucin im Gegensatze zum unnatürlichen teilweise zu synthetischen Prozessen Verwendung findet.

Hiermit stimmt aufs beste überein, daß nach der Durchströmung mit einer d-l-Aminosäure die unnatürliche Komponente überwiegend zurückbleibt, d. h. also, die weniger abgebaute natürliche Komponente ist stärker verschwunden als die mehr abgebaute unnatürliche.

In einer der vorangehenden Arbeiten hat S. Oppenheimer

gezeigt, daß Glycerin ein ausgezeichneter Milchsäurebildner in der künstlich durchbluteten Leber ist. Es scheint zum mindesten wahrscheinlich, daß die Milchsäurebildung aus Glycerin den Weg über Glycerinaldehyd nimmt. Die Tatsache, daß die aus Glycerin gebildete Milchsäure die natürliche d-Milchsäure ist, läßt die Annahme notwendig erscheinen, daß die Oxydation des Glycerins zum Glycerinaldehyd asymmetrisch erfolgt, d. h. daß nur die natürliche Form des Glycerinaldehyds bei dieser Oxydation auftritt.

Nach der von uns gemachten Annahme ist Glycerinaldehyd das erste — durch Sprengung einer aldolartigen Bindung gebildete — Spaltprodukt des Traubenzuckers.

Diese Annahme würde wesentlich gestützt werden, wenn es gelänge zu zeigen, daß Glycerinaldehyd im Tierversuch mit besonderer Leichtigkeit Traubenzucker bildet.

Wir haben in Gemeinschaft mit Frau Dr. Wittenberg auf eine synthetische Traubenzuckerbildung aus Glycerinaldehyd hinzielende Versuche an der künstlich durchbluteten Hundeleber unternommen. Diese Versuche sind noch nicht zu völligem Abschlusse gelangt. Aber wir müssen es bereits auf Grund unserer bisherigen Ergebnisse als äußerst wahrscheinlich bezeichnen, daß Glycerinaldehyd in der Tat in der isolierten Hundeleber mit ganz besonderer Leichtigkeit Zucker bildet.

Wir sind durch die Tatsache, daß offenbar die optische Beschaffenheit des Glycerinaldehyds von bestimmendem Einfluß auf die sterische Anordnung der aus ihm entstehenden Milchsäure ist, daß also während der Umwandlung von Glycerinaldehyd in Milchsäure das mittlere Kohlenstoffatom seine asymmetrische Beschaffenheit dauernd behält, zu der Anschauung gelangt, daß die Umwandlung von Glycerinaldehyd in Milchsäure erfolgt durch einfache Oxydation der Aldehydgruppe auf Kosten des Sauerstoffes der primären Alkoholgruppe.

Anders müssen die Verhältnisse bei der Umwandlung des Dioxyacetons in Milchsäure liegen, da hier ja die mittelständige Carbonylgruppe zur sekundären Alkoholgruppe reduziert werden muß.

Wenn sich die Umwandlung des Dioxyacetons zu Milchsäure in analoger Weise vollziehen würde wie die des Glycerinaldehyds, so würde der Sauerstoff der einen primären Alkohol-

gruppe oxydierend auf die zweite primäre Alkoholgruppe, zwei Wasserstoffatome dieser zweiten primären Alkoholgruppe reduzierend auf die Carbonylgruppe wirken müssen, wie es in den beiden Pfeilen der untenstehenden Dioxyacetonformel zum Ausdruck kommt:



Während also, um es nochmals zu wiederholen, offenbar bei der Umwandlung von Glycerinaldehyd in Milchsäure das mittlere Kohlenstoffatom unbeteiligt bleibt, muß es bei der Umwandlung von Dioxyaceton in Milchsäure in Mitleidenschaft gezogen werden.

Sollte diese Umlagerung in der eben angedeuteten Weise sich vollziehen, so würde wohl während des Umwandlungsstadiums die Bindung zwischen dem mittleren C-Atom und dem in Oxydation begriffenen endständigen C-Atom des Dioxyacetonmoleküls stark gelockert werden.

Vielleicht ließen sich an der Hand der eben erörterten Vorstellungen einige wichtige Beobachtungen von E. Buchner und J. Meisenheimer über die Bildung von Milchsäure im Hefepreßsaft und über die Rolle des Dioxyacetons als intermediäres Produkt bei der alkoholischen Gärung erklären. Wenn man nämlich sich vorstellen würde, daß die Umwandlung von Dioxyaceton in Äthylalkohol und Kohlensäure erfolgt in dem Augenblick, in dem Dioxyaceton zur Milchsäure gleichsam zusammenstürzt, ohne daß es zum völligen Einsturz kommt, d. h. ohne daß die Milchsäurebildung vollendet wird, so wäre damit vielleicht sowohl die leichte Umwandelbarkeit des Dioxyacetons in Alkohol und Kohlensäure bei der alkoholischen Gärung, als auch die Bildung von Milchsäure im Hefepreßsaft dem Verständnis nähergerückt. Der Mechanismus der intakten Hefezellen greift während des Prozesses der Umlagerung des Dioxyacetons in Milchsäure mit derartiger Vollkommenheit ein, daß es überhaupt nicht zur Bildung von fertiger, molekularer Milchsäure kommt, sondern das noch in Reaktion befindliche, durch gleichzeitige Anlagerung von Sauerstoff und Ab-

spaltung von Wasserstoff oxydierte C-Atom sich als Kohlensäure von seinem Nachbaratom abtrennt. Der Hefepreßsaft arbeitet nicht mehr mit der gleichen Vollendung wie die Hefezelle. Er vermag nicht, die im Augenblick der Umwandlung zu Milchsäure sich lockernden Kohlenstoffatome des Dioxyacetons restlos unter Bildung von Alkohol und Kohlensäure auseinander zu sprengen, und so kommt es im Hefepreßsaft zur Bildung von Milchsäure.

Wenn die eben geäußerten Vorstellungen über den Chemismus der alkoholischen Gärung richtig sein sollten, so kann Alkohol ausschließlich auf dem Wege über Dioxyaceton entstehen. Die Vergärbarkeit des Glycerinaldehyds wäre nur erklärbar durch die Annahme, daß diese Substanz zunächst in Dioxyaceton umgelagert wird. Diese Vorstellung bereitet allerdings keine wesentlichen Schwierigkeiten, da bekanntlich die Umlagerung von Glycerinaldehyd in Dioxyaceton nach den Untersuchungen von A. Wohl und C. Neuberg außerordentlich leicht erfolgt. Auch bei der Vergärung des Traubenzuckers durch Hefe tritt sehr möglicher Weise zunächst Glycerinaldehyd auf, der erst sekundär in Dioxyaceton umgelagert wird, so daß die Umlagerung von Glycerinaldehyd in Dioxyaceton nichts Anormales, sondern eine Phase auf dem Hauptwege der Vergärung von Traubenzucker zu Alkohol und Kohlensäure darstellen würde.

Die hier geäußerten Vorstellungen haben zunächst natürlich rein hypothetischen Wert, dürften aber einer experimentellen Prüfung zugänglich sein.

Auf die engen biologischen Beziehungen des Glycerinaldehyds zu einem anderen normalen intermediären Stoffwechselprodukt wird in einer der folgenden Arbeiten noch näher einzugehen sein.

Wir gehen somit zur näheren Besprechung der Milchsäurebildung aus Dioxyaceton über.

Die Versuche mit Blutkörperchen haben wir zum Teil bereits erwähnt und namentlich hervorgehoben, daß Dioxyaceton durch Blutkörperchen in weit geringerem Umfange als Glycerinaldehyd in Milchsäure umgewandelt wird.

Das gleiche ist, in einem bisher allerdings vereinzelten Versuche, bei der Durchblutung der Leber der Fall.

In Versuch 3 der Tabelle II wurde in genau der gleichen Weise, wie früher mit Glycerinaldehyd, ein Durchströmungsversuch unter Zusatz von 10 g Dioxyaceton vorgenommen. Auch hier betrug die Durchblutungszeit 60 Minuten. An je 1200 ccm Blutfiltrat A und B wurden titrimetrische Milchsäurebestimmungen ausgeführt.

Die Milchsäurezunahme pro 6000 ccm Blutfiltrat während der Durchblutung war hier 0,1665 g, gegenüber mehr als 0,7485 g im ersten und 1,1580 g im zweiten Glycerinaldehydversuch.

In einer Reihe von Blutkörperchenversuchen, die in ganz ähnlicher Weise, wie früher geschildert, ausgeführt wurden, bemühten wir uns, das gebildete Lactat zu isolieren. Die Gesamtmenge des in jedem Einzelversuch isolierten Zinklactats drehte im Sinne des Salzes der d-Milchsäure, was kaum anders zu erwarten war, da die Menge der aus Dioxyaceton gebildeten Milchsäure in einem Teile der Versuche nicht wesentlich größer war, als die im Leerversuch B_1 vorhandene.

Das aus mehreren Dioxyacetonversuchen erhaltene Zinksalz wurde in Wasser aufgenommen. Die erste beim vorsichtigen Einengen in der Kälte erhaltene Krystallfraktion wog lufttrocken 0,0575 g. Nach dem Trocknen bei 110° zur Gewichtskonstanz war ein Wasserverlust von 0,0096 eingetreten. Hieraus berechnete Menge Krystallwasser: 16,70%.

Der Krystallwassergehalt dieses Zinksalzes würde also dem eines mit etwas aktivem, milchsaurem Zink verunreinigten Präparats von gärungsmilchsaurem Zink entsprechen.

Die gesamte Substanzmenge (0,0479 g) wurde in wenig mehr als 10 ccm Wasser gelöst. Sie zeigte bei der polarimetrischen Untersuchung im dreiteiligen Landoltschen Apparate keinerlei optische Aktivität. Hätte es sich um aktives, milchsaures Zink gehandelt, so wäre bei der in Frage kommenden Konzentration und der Empfindlichkeit des Apparates eine zwar schwache, aber deutliche Drehung zu erwarten gewesen.

Wenngleich es uns auf Grund dieses Versuches wahrscheinlich ist, daß das Dioxyaceton d-l-Milchsäure gebildet hatte, so möchten wir ihm vor seiner Wiederholung in größerem Maßstabe keine entscheidende Bedeutung beimessen, um so mehr, als bei der geringen Menge des uns zur Verfügung stehenden

Materials eine Zinkbestimmung an der optisch inaktiven Krystallfraktion nicht ausgeführt werden konnte.

In dem eben besprochenen Durchblutungsversuch mit Dioxyaceton wurden 4000 ccm Blutfiltrat B in der üblichen Weise auf milchsaures Zink weiterverarbeitet. Es wurden zwei Krystallfraktionen erhalten, deren erste lufttrocken 0,1293 g, krystallwasserfrei 0,1130 g wog. Der Krystallwassergehalt betrug also 0,0161 g oder 12,45 $^0/_0$, was sehr annähernd dem Krystallwassergehalt des natürlichen milchsauren Zinks entspricht. Auch die optische Untersuchung ergab einen Wert, der sich jedenfalls nicht sehr weit von dem für natürliches milchsaures Zink bei der in Frage kommenden Konzentration entfernte.

Eine zweite Fraktion, welche krystallwasserhaltig 0,1299 g wog, zeigte bezüglich ihres Krystallwassergehaltes und ihres optischen Verhaltens keine merklichen Abweichungen von der ersten Fraktion.

Hiernach war also bei der Durchblutung der Leber aus Dioxyaceton natürliches, milchsaures Zink gebildet worden, während unter der Einwirkung gewaschener Blutkörperchen anscheinend die d-l-Form der Milchsäure entstanden war.

Wir möchten vor einer Wiederholung beider Versuchsarten aus diesem Verhalten keine weiteren Schlüsse ziehen. Sollte es sich aber bestätigen, daß die Blutkörperchen Dioxyaceton in d-l-Milchsäure umwandeln, so wäre es damit entschieden, daß Dioxyaceton nicht beim Abbau des Traubenzuckers zu d-Milchsäure durch Blutkörperchen als intermediäres Produkt in Betracht kommen kann.

Es würde dann sehr nahe liegen, daran zu denken, daß auch der Abbau von Dioxyaceton in der künstlich durchbluteten Leber, soweit er zu natürlicher Milchsäure führt, nicht durch direkte Umlagerung des Dioxyacetons zu Milchsäure, sondern unter intermediärer Bildung von Glycerinaldehyd, und zwar von optisch aktivem Glycerinaldehyd führt. Wissen wir doch durch die Untersuchungen von Wohl und Neuberg[1]), daß sich Dioxyaceton sehr leicht bei alkalischer Reaktion in Glycerinaldehyd umlagert.

---

[1]) A. Wohl und C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 3099, 1900.

Eine andere Möglichkeit, die Bildung von natürlicher Milchsäure aus Dioxyaceton bei der Leberdurchblutung zu erklären, wird in der bereits erwähnten Arbeit von Embden, Schmitz und Baldes zur Sprache kommen.

Als sichergestellte Tatsache dürfen wir ansehen, daß Glycerinaldehyd in weitaus höherem Maße als Dioxyaceton von Blutkörperchen und auch von der durchbluteten Leber in Milchsäure übergeführt wird und überhaupt unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen für die tierischen Gewebe weit angreifbarer als Dioxyaceton ist.

Das ist von Interesse im Hinblick auf die in der nachfolgenden Arbeit von Max Oppenheimer mitgeteilten Versuche über die Einwirkung von Alkali auf die beiden in Frage kommenden Substanzen, und mehr noch unter Berücksichtigung der von Buchner und Meisenheimer[1]) am Glycerinaldehyd und Dioxyaceton bei der Hefegärung gemachten Erfahrungen.

Während im tierischen Organismus Glycerinaldehyd weit angreifbarer als Dioxyaceton ist, ist bei der Hefegärung nach den eben genannten Autoren das Umgekehrte der Fall, so daß Buchner und Meisenheimer die hypothetische Annahme der intermediären Bildung von Dioxyaceton bei der alkoholischen Gärung als die geeignetste ansehen, um den Mechanismus des Zuckerzerfalls zu erklären.

Bekanntlich kommt es, zwar nicht unter der Einwirkung lebender Hefe, wohl aber im Hefepreßsaft des öfteren zu einer Bildung von Milchsäure, die Buchner und Meisenheimer[2]) vorübergehend zu der Annahme von Milchsäure als intermediäres Produkt bei der alkoholischen Gärung führte.

Die auftretende Milchsäure ist stets ausschließlich d-l-Milchsäure. Buchner und Meisenheimer betonen, daß das Auftreten von Dioxyaceton als intermediäres Produkt bei der Hefegärug es leicht verständlich machen würde,

---

[1]) E. Buchner und J. Meisenheimer. Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 1773, 1910.

[2]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 417, 1904. Dieselben, Dasselbe. 2. Mitteilung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 620, 1905.

daß bei der zellfreien Gärung verschiedener Zuckerarten immer die Racemform der Milchsäure gebildet wird, weil Dioxyaceton symmetrischen Aufbau besitzt[1]).

Wir möchten auf Grund unserer Erfahrungen glauben, daß als Zwischenprodukt bei dem zu optisch aktiver Milchsäure führenden Traubenzuckerabbau im tierischen Organismus praktisch weitaus an erster Stelle optisch aktiver Glycerinaldehyd in Betracht kommt. Im Zusammenhalt mit den Ergebnissen von Buchner und Meisenheimer liegt es nahe, ganz allgemein als Muttersubstanz der d-Milchsäure optisch aktiven Glycerinaldehyd, als Muttersubstanz der d-l-Milchsäure[2]) Dioxyaceton anzunehmen.

Diese Anschauung wird nicht nur an der Hand weiterer Tierexperimente, sondern auch durch entsprechende Beobachtungen an Hefepreßsaft und Bakterien einer weiteren Prüfung unterzogen werden müssen.

---

[1]) Dieselben, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 43, 1781, 1910.

[2]) Die von Gadamer (Apotherzeitung 12, 642, 1897) festgestellte Tatsache, daß Gärungsmilchsäure geringe Mengen natürlicher Milchsäure enthält und die in letzter Zeit namentlich von Paul Mayer (diese Zeitschr. 9, 533, 1908; 40, 441, 1912) gemachte Beobachtung, daß das Kaninchen unter Umständen Gärungsmilchsäure ausscheidet, dürften dementsprechend vielleicht darauf zurückzuführen sein, daß bei der bakteriellen Milchsäuregärung neben Dioxyaceton geringe Mengen natürlichen Glycerinaldehyds, beim Zuckerabbau im Kaninchenorganismus geringe Mengen Dioxyaceton neben natürlichem Glycerinaldehyd auftreten können.

Über die Einwirkung verdünnter Natronlauge auf Glycerinaldehyd und Dioxyaceton.

Von

Max Oppenheimer.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

Auf Grund der vorangehenden Arbeit[1]) darf es als höchst wahrscheinlich angesehen werden, daß der im Tierkörper erfolgende Abbau des Traubenzuckers zu d-Milchsäure seinen Weg im wesentlichen über optisch aktiven Glycerinaldehyd nimmt.

Andererseits scheint auf Grund der Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer[2]) als intermediäres Produkt bei der alkoholischen Gärung des Zuckers durch Hefe Dioxyaceton in erster Linie in Betracht zu kommen, und auch für die Gärungsmilchsäure, die Buchner und Meisenheimer im Hefepreßsaft gefunden haben, wird von ihnen Dioxyaceton als Vorstufe angenommen.

Embden, Baldes und Schmitz sprachen auf Grund der an Hefe und Hefepreßsaft vorgenommenen Untersuchungen von Buchner und Meisenheimer im Zusammenhalt mit ihren eigenen Versuchsergebnissen am tierischen Organismus die Vermutung aus, daß allgemein die unter dem Einfluß lebender Organismen aus Traubenzucker gebildete d-Milchsäure hauptsächlich auf dem Wege über Glycerinaldehyd, die Gärungsmilchsäure auf dem Wege über Dioxyaceton entstünde.

---

[1]) Embden, Baldes und Schmitz, diese Zeitschr. **45**, 108, 1912.

[2]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 1773, 1910.

Wie so häufig die an bestimmten Substanzen in lebenden Organismen sich abspielenden Reaktionen eine gewisse Ähnlichheit bieten mit der Einwirkung von Alkalien auf diese Substanzen, so scheint dies auch beim Abbau des Zuckers der Fall zu sein.

Wissen wir doch durch ältere Untersuchungen, u. a. von Hoppe-Seyler[1]) und Kiliani[2]), sowie durch neuere von Pinkus[3]), Nef[4]), Buchner, Meisenheimer, Schade[5]), Framm[6]) und Jolles[7]), daß bei der Einwirkung von Alkalien auf Traubenzucker sich unter anderen Produkten auch inaktive Milchsäure bildet, bei genügend langer Einwirkung sogar in recht beträchtlicher Menge.

Schon ohne Berücksichtigung der biologischen Verhältnisse, mehr aber noch nach deren Kenntnis, mußten als Zwischenprodukte auch bei der durch Alkali erfolgenden Umwandlung von Traubenzucker in Milchsäure in erster Linie Dioxyaceton und Glycerinaldehyd in Betracht gezogen werden.

Versuche, die die Bildung von Milchsäure aus racemischem Glycerinaldehyd unter dem Einfluß von Alkali dartun, sind bisher anscheinend nur von Nef[8]) ausgeführt worden. Nef fand, daß d-l-Glycerinaldehyd, d-Glucose und d-Fructose bei der Behandlung mit $1^1/_2$ Teilen $15^0/_0$iger Natronlauge im Einschmelzrohr bei 40 bis 50° dieselben Produkte in etwa gleicher Menge, unter anderem auch d-l-Milchsäure lieferten.

Auch unter etwas abweichenden Versuchsbedingungen erhielt Nef aus Glycerinaldehyd Milchsäure.

Mit Dioxyaceton scheinen überhaupt noch keine auf Milchsäurebildung bezüglichen Versuche gemacht zu sein.

Allerdings berichten Buchner und Meisenheimer[9]) in

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **4**, 396, 1871.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 701, 1882; vgl. E. von Lippmann, Chemie der Zuckerarten 1904, S. 328, 718 und 835.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 31, 1898.

[4]) Annal. **335**, 254, 1904; **357**, 296, 1907.

[5]) Ber. d. Deusch. chem. Ges. **38**, 623, 1905; **39**, 4217, 1906; **41**, 1009, 1908. — Zeitschr. f. physikal. Chem. **57**, 6, 1906.

[6]) Arch. f. d. ges. Physiol. **64**, 587, 1896.

[7]) Diese Zeitschr. **29**. 152, 1910.

[8]) Nef, Annal. **335**, 323, 1904.

[9]) Buchner und Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 1642, 1912.

einer soeben — nach Abschluß meiner Versuche — erschienenen Arbeit über einen Versuch E. Buchners mit Dioxyaceton und 5%iger Natronlauge, bei dem jedoch offenbar die Bildung von Milchsäure nicht berücksichtigt wurde.

Bei meinen eigenen Versuchen bemühte ich mich, nicht nur den Nachweis zu führen, daß Glycerinaldehyd und Dioxyaceton unter der Einwirkung von Alkali überhaupt Milchsäure bilden. Ich suchte auch zu entscheiden, ob die Milchsäurebildung aus den beiden Triosen rascher erfolgt, als aus Traubenzucker, wie das von vornherein zum mindesten sehr möglich ist, wenn wirklich Glycerinaldehyd und Dioxyaceton bei der durch Alkali bedingten Milchsäurebildung aus Traubenzucker als Zwischenprodukte in Betracht kommen.

Ferner erschien es von Interesse, ob von den beiden Triosen Glycerinaldehyd, der offenbar in erster Linie die Vorstufe der d-Milchsäure im Tierkörper bildet, oder Dioxyaceton, das mutmaßliche Zwischenprodukt bei der Bildung von d-l-Milchsäure im Hefepreßsaft und vielleicht auch bei der bakteriellen Milchsäuregärung, leichter durch Alkali in Milchsäure umgelagert würde.

Meine Versuche wurden bei möglichstem Licht- und Luftausschluß unter Vermeidung jeglichen Oxydationsmittels angestellt.

Ich beschränkte mich darauf, die Menge der aufgetretenen Milchsäure festzustellen; eine Ausdehnung der Untersuchung auf andere eventuell auftretende Reaktionsprodukte lag nicht im Plane dieser Arbeit.

Es zeigte sich nun tatsächlich, daß sowohl Glycerinaldehyd wie Dioxyaceton bereits beim Stehenlassen mit der 30fachen Menge n-Natronlauge bei Zimmertemperatur nach 24 Stunden beträchtliche Mengen d-l-Milchsäure bildeten, während sich $^{n}/_{10}$-Natronlauge als zu schwach erwies. Bei Erhöhung der Temperatur auf 40° wurden fast dieselben Mengen Milchsäure schon nach einer Stunde gebildet, bei Brutschranktemperatur (37°) waren nach 24 Stunden fast 50% der angewandten Substanz in Milchsäure umgelagert.

Vergleichsweise wurden dieselben Versuche teilweise mit Traubenzucker (Kahlbaum) angestellt, und das Ergebnis dieser vergleichenden Versuche ist, daß, während Traubenzucker zu-

nächst ziemlich langsam reagiert, Glycerinaldehyd rasch, und Dioxyaceton fast doppelt so rasch Milchsäure bilden. Das Verhältnis der gebildeten Mengen blieb bei Zimmertemperatur auch noch nach 24 Stunden dasselbe, während sich bei 37° nach 24 Stunden die Unterschiede wieder ausgeglichen hatten.

Nach den heutigen Vorstellungen über den Zuckerabbau war die Milchsäurebildung aus Glycerinaldehyd und Dioxyaceton durch intramolekulare Umlagerung zu erwarten und bot nichts Überraschendes. Daß Traubenzucker langsamer reagiert, dürfte sich wohl daher erklären, daß die erste Phase des Zuckerabbaues, die Aufsprengung des Zuckermoleküls in der Mitte, die der nachherigen Umlagerung der Spaltungsprodukte in Milchsäure vorausgehen muß, nur allmählich eintritt. Diese Umlagerung vollzieht sich bei Dioxyaceton am leichtesten, während im Tierversuche Glycerinaldehyd weitaus stärker als Dioxyaceton Milchsäure bildet.

Die Tatsache der so überaus leicht erfolgenden chemischen Umlagerung von Glycerinadehyd und Dioxyaceton zu Milchsäure dürfte auf alle Fälle als eine weitere wertvolle Stütze für die Annahme dieser Verbindungen als Zwischenprodukte beim Zuckerzerfall in lebenden Organismen anzusehen sein.

Experimentelles.

Die Versuchsanordnung war im wesentlichen dieselbe wie bei Meisenheimer[1]). Genau gewogene Mengen Substanz wurden mit der 30fachen Menge n-Natronlauge (bei Versuchsreihe III $^{n}/_{10}$-Natronlauge) in gut verschlossener brauner Flasche im Dunkeln entweder bei Zimmertemperatur oder bei 37° im Brutschrank aufbewahrt, beim Einstunden-Versuch im Wasserbade bei 40° erwärmt. Bei den ersten drei orientierenden Versuchen (Tabelle I) wurde mit $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure unter Verwendung von Methylrot der Anfangs- und Endtiter bestimmt. Aus der verschiedenen Titerabnahme ergab sich hier schon der Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit. Zur Identifizierung der Milchsäure wurde in diesen ersten, wie in den weiteren Versuchen die Flüssigkeit nach beendeter Reaktion wie folgt aufgearbeitet: Die Flüssigkeit wurde mit Salzsäure

[1]) Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1014, 1908.

neutralisiert und dann im Lindschen Extraktionsapparat unter Zusatz von 15 ccm Phosphorsäure (60%ig) und 90 g Ammonsulfat 40 Stunden mit Äther extrahiert. Es sei hier bemerkt, daß sich die Glycerinaldehyd- und Dioxyaceton-Lösungen, ebenso wie dies früher schon für Traubenzucker angegeben ist, unter der Einwirkung der Natronlauge je nach der Dauer des Versuchs gelb bis tiefdunkelrotbraun färbten uud daß diese gefärbten Substanzen auch in die ätherische Lösung mit übergingen. Der Grad der Färbung scheint im direkten Verhältnis zu der Größe der Milchsäurebildung zu stehen, also von einer Parallelreaktion herzurühren.

Nach dem Abdestillieren des Äthers (der Ätherlösung wurden vorher etwa 40 ccm Wasser zugefügt) wurde unter Zusatz weiterer Wassermengen (ca. 200 ccm) einige Stunden mit gereinigtem Zinkcarbonat auf dem Wasserbade erwärmt und im übrigen das Zinklactat in bekannter Weise isoliert und gewogen. Der Milchsäuregehalt der Mutterlauge, die, wie nebenbei erwähnt sei, namentlich bei Dioxyaceton stets einen stark caramelartigen Geruch hatte und nach dem Einengen auf dem Wasserbade einen rotbraunen, durchsichtigen, zähen Sirup bildete, wurde nach dem verbesserten Verfahren von v. Fürth und Charnaß in der im hiesigen Institut üblichen Weise[1]) titrimetrisch bestimmt, ebenso wie die Gesamtmilchsäure, wenn die erhaltene Menge für eine Gewichtsbestimmung zu gering war (vgl. Tabelle II). Während das Zinklactat, wie die ausgeführten Analysen bewiesen, genügend rein war, ist allerdings der titrimetrischen Milchsäurebestimmung der Mutterlauge nur ein bedingter Wert beizumessen, da es nicht ausgeschlossen, wenn auch nicht wahrscheinlich ist, daß in der Lauge noch andere Substanzen sich fanden, die mit Kaliumpermanganat flüchtige, bisulfitbindende Verbindungen geben. Übrigens ergab auch der Laugenrückstand bei der Bestimmung meistens nur ungefähr $^1/_5$ bis $^1/_3$ seiner Gesamtmenge Milchsäure, während der Rest ein nicht näher untersuchtes Produkt einer Nebenreaktion zu sein scheint.

Alles weitere ergibt sich aus den folgenden Tabellen.

[1]) Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 1256.

Tabelle I.

	Traubenzucker	Glycerinaldehyd	Dioxyaceton
Angewandte Menge . .	3,0 g	3,0 g	3,0 g
Zugesetzte n-NaOH . .	90 ccm	90 ccm	90 ccm
Anfangstiter für 5 ccm Flüssigkeit	48,6 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4	47,9 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4	48,6 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4
Titer nach 24 Std. . .	47,5 „ „	44,8 „ „	42,6 „ „
Titerabnahme	1,1 „ „	3,1 „ „	6,0 „ „

Tabelle II.

Versuchs-Nr.		Substanz	Angew. Menge g	Alkali	Angew. Menge ccm	Versuchsdauer Stunden	Temperatur	Erhaltene Milchsäure durch Wägung g	durch Titrat. g	Total g
II	1	Glycerinaldehyd	2,0	n-NaOH	60	24	Zimmer-	0,2149	0,1073	0,3222
	2	Dioxyaceton	2,0	n-NaOH	60	24	Temper.	0,3612	0,1971	0,5583
III	1	Glycerinaldehyd	2,0	$^{n}/_{10}$-NaOH	60	24	Zimmer-	—	0,0018	0,0018
	2	Dioxyaceton	2,0	$^{n}/_{10}$-NaOH	60	24	Temper.	—	0,0032	0,0032
IV	1	Traubenzucker	2,0	n-NaOH	60	1	40°	—	0,0576	0,0576
	2	Glycerinaldehyd	2,0	n-NaOH	60	1	40°	0,1825	0,1012	0,2837
	3	Dioxyaceton	2,0	n-NaOH	60	1	40°	0,3856	0,0594	0,4450
V	1	Traubenzucker	2,0	n-NaOH	60	1	40°	—	0,0809	0,0809
	2	Glycerinaldehyd	2,0	n-NaOH	60	1	40°	0,2554	0,0607	0,3161
	3	Dioxyaceton	2,0	n-NaOH	60	1	40°	0,4416	0,0535	0,4951
VI	1	Traubenzucker	2,0	n-NaOH	60	24	37°	0,8208	0,1471	0,9679
	2	Glycerinaldehyd	2,0	n-NaOH	60	24	37°	0,8008	0,1282	0,9290
	3	Dioxyaceton	2,0	n-NaOH	60	24	37°	0,7984	0,1395	0,9379

Analysen.

1. Zinklactat aus Glycerinaldehyd:

0,4382 g Substanz: 0,0808 g H_2O, 0,1190 g ZnO

$(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$. Ber. H_2O: 18,18%. ZnO: 27,27%

Gef. „ 18,43 „ „ 27,15 „

2. Zinklactat aus Dioxyaceton:

0,4554 g Substanz: 0,0820 g H_2O, 0,1220 g ZnO

$(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$. Ber. H_2O: 18,18%. ZnO: 27,27%

Gef. „ 18,00 „ „ 26,78 „

Über das Auftreten aldehydartiger Substanzen bei der Leberdurchblutung und über Acetessigsäurebildung aus Äthylalkohol.

Von

Niro Masuda.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In einer größeren Anzahl früherer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß bei der künstlichen Durchblutung der Leber Acetessigsäure gebildet wird. Zusatz bestimmter Substanzen vermehrt den Umfang der Acetessigsäurebildung, während andere Körper ohne Einfluß auf deren Größe bleiben.

Die zur Acidosis führende eigenartige Stoffwechseländerung, die der zuckerkranke Organismus erleidet, fand ihren Ausdruck in Versuchen, die an der überlebenden Leber pankreasloser und phlorizinvergifteter Tiere vorgenommen wurden. Es zeigte sich nämlich, daß die Leber diabetischer Tiere ohne Zusatz einer acetessigsäurebildenden Substanz weitaus größere Mengen Acetessigsäure bildet als die gesunder.

Die eben kurz erwähnten Versuche waren in ihrer Ausführung deswegen relativ einfach, weil die Substanzen, deren Bildung im Durchblutungsversuch untersucht wurde, wie das Aceton selbst flüchtig waren, oder wie die Acetessigsäure beim Erwärmen ihrer sauren Lösungen quantitativ in das flüchtige Aceton übergingen.

War es nun nicht möglich, neben der Bildung von Acetessigsäure und Aceton die Bildung anderer flüchtigen Substanzen bei der Durchblutung nachzuweisen und womöglich die Natur dieser Substanzen festzustellen?

An zwei Gruppen von Körpern war hier in erster Linie zu denken: einmal an flüchtige Säuren, die offenbar bei ver-

schiedenartigen Abbauprozessen auftreten können, und zweitens an flüchtige Substanzen aldehydartiger Natur.

Gelangt man doch mehr und mehr zu der Überzeugung, daß auch der tierische Organismus in weitgehendem Maße synthetischer Reaktionen der verschiedensten Art fähig ist, und spricht doch nicht nur die Analogie mit rein chemischen Vorgängen, sondern auch manche biologische Erfahrung für die gewichtige Rolle aldehydartiger Gruppierungen bei derartigen synthetischen Vorgängen. Hier sei z. B. hingewiesen auf die Ausführungen von Knoop[1]) in seiner Abhandlung über den Abbau aromatischer Fettsäuren, auf die theoretischen Erwägungen von Spiro und Magnus-Levy[2]) über die Möglichkeit der Bildung synthetischer Produkte von etwa beim Abbau intermediär entstehendem Acetaldehyd und auf die an diese Erwägungen sich anschließende experimentelle Überführung von Acetaldehydammoniak bei der künstlichen Durchströmnng der Leber in Acetessigsäure durch E. Friedmann[3]).

Ein bestimmter, allem Anscheine nach in größter Menge intermediär gebildeter Aldehyd, nämlich der Glycerinaldehyd, der offenbar auch im Organismus sehr synthesenfähig ist, sei hier nur kurz erwähnt, da in der voranstehenden Arbeit von Embden, Baldes und Schmitz ausführlich von ihm die Rede war.

In der vorliegenden Untersuchung, die ich auf Veranlassung von Prof. Embden vornahm, habe ich mir zunächst nur die Frage vorgelegt: treten bei der künstlichen Durchblutung der Leber neben Acetessigsäure und neben Aceton andere flüchtige jodbindende Substanzen auf und lassen sich eventuell Anhaltspunkte für die Natur dieser flüchtigen jodbindenden Substanzen gewinnen?

Ich will gleich hier erwähnen, daß offenbar unter gewissen Umständen tatsächlich solche Substanzen in der künstlich durchströmten Leber gebildet werden, daß über die Natur dieser Substanzen in einzelnen Fällen wohlbegründete Vor-

---

[1]) Fr. Knoop, Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 150, 1905.

[2]) Magnus-Levy, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42, 225.

[3]) E. Friedmann, Zur Kenntnis des Abbaus der Carbonsäuren im Tierkörper. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 202, 1908.

stellungen gewonnen wurden, ihre exakte Identifizierung hingegen den Gegenstand augenblicklich noch im Gange befindlicher Untersuchungen im hiesigen Institut bildet[1]).

Methodisches.

Da sich stets bei der künstlichen Durchströmung der Leber Acetessigsäure und Aceton bilden, so mußte, wenn neben diesen Substanzen andere jodbindende, mit Wasserdampf leicht flüchtige Körper nachgewiesen werden sollten, eine Methode gefunden werden, die es gestattet, das entweder schon bei der Leberdurchblutung auftretende oder bei dem Erwärmen des sauren Filtrats aus Acetessigsäure abgespaltene Aceton von diesen andersartigen Substanzen zu unterscheiden.

Ich habe verschiedene Mittel versucht, die in dem aus dem Durchblutungsblut gewonnenen Destillat die Zerstörung aldehydartiger Substanzen bewirken sollten, ohne das Aceton anzugreifen. Zuerst machte ich im Anschluß an die von Shaffer[2]) für die Oxybuttersäurebestimmung angegebene Methode eine Reihe von Versuchen mit Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge, ferner mit Wasserstoffsuperoxyd und Ferrosulfat. Doch gab ich diese Versuche wieder auf, als ich im frischgefällten feuchten Silberoxyd ein Mittel fand, das auch beim Erhitzen wässeriger Acetonlösungen das Aceton vollkommen unangegriffen läßt, während doch Aldehyd unter den gleichen Versuchsbedingungen bekanntlich mit Leichtigkeit zerstört wird. Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß bereits E. Friedmann gelegentlich seiner eben erwähnten Versuche über Acetessigsäurebildung aus Acetaldehyd zur Zerstörung des Aldehyds die aus dem Durchblutungsblut gewonnenen Destillate längere Zeit mit Silberoxyd in der Kälte schüttelte, wobei freilich Acetonverluste auftraten.

Ich will auf die in Betracht kommenden methodischen Vorversuche, die teils an reinen Acetonlösungen, teils an Lösungen von reinem Acetaldehyd, teils an Gemengen beider Substanzen vorgenommen wurden, nur ganz kurz eingehen:

[1]) Schon hier sei darauf hingewiesen, daß bereits E. Friedmann der genannten Frage experimentell nähergetreten ist. Von seinen Untersuchungen wird weiterhin wiederholt die Rede sein.

[2]) Ph. Shaffer, Journ. of Biolog. Chem. 5, 211, 1908—09.

Ich bediente mich bei diesen Versuchen eines einfachen Destillationsapparates, der außer mit einem absteigenden Schlangenkühler, dessen Rehr in eine eisgekühlte Wasservorlage eintauchte, über dem Destillationskolben noch einen zweiten Schlangen- oder Kugelkühler trug, der nach Belieben als Rückflußkühler ein- und ausgeschaltet werden konnte[1]).

Man fügt zu 200 ccm Wasser eine gemessene Menge einer stark verdünnten Lösung von Aceton, deren Titer nach der Messinger-Huppertschen Methode festgestellt wurde.

In den Destillationskolben kommt außerdem eine ausreichende Menge frisch gefälltes feuchtes Silberoxyd und zur Verhinderung von Siedeverzug etwas Talkum.

Der Rückflußkühler sowohl wie der absteigende Kühler werden in Tätigkeit gesetzt und die Flüssigkeit allmählich bis zum Sieden erhitzt.

Das Sieden unter Rückfluß wird etwa 15 Minuten fortgesetzt, dann das Kühlwasser aus dem Rückflußkühler entfernt und etwa 30 Minuten am absteigenden Kühler destilliert. Die Acetonbestimmung im Destillate erweist, wie ich mich in zahlreichen übereinstimmenden Versuchen überzeugen konnte, daß keine bestimmbare Acetonmenge bei der eben geschilderten Destillation mit Silberoxyd in Verlust gerät. Die im Destillate aufgefundenen Acetonmengen stimmen vielmehr innerhalb der unvermeidlichen Fehlergrenzen der Bestimmung auf das beste mit der zugesetzten Acetonmenge überein. Einige Beispiele mögen genügen: 10 ccm einer Acetonlösung, die 17,9 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung entsprachen, also 17,9 · 0,967 mg Aceton enthielten, wurden der eben geschilderten Behandlung unterworfen. Die im Destillat gefundene Acetonmenge war 18,0 · 0,967 mg. 10 ccm einer Acetonlösung, die 18,1 · 0,967 mg Aceton enthielten, lieferten unter den gleichen Bedingungen 18,1 · 0,967 mg. 25 ccm einer Acetonlösung, die 20,2 · 0,967 mg Aceton enthielten, ergaben 20,1 · 0,967 mg Aceton.

Im Gegensatz zu der von Friedmann gewählten Versuchsanordnung des Schüttelns mit Silberoxyd in der Kälte tritt also bei dem von mir angewendeten Verfahren ein merk-

[1]) Mit Vorteil läßt sich sicherlich für die hier zu schildernden Versuche der in einer folgenden Arbeit von Embden und Baldes beschriebene Doppeldestillationsapparat verwenden.

licher Acetonverlust beim Behandeln reiner Acetonlösungen nicht ein. (In dem von Friedmann, l. c. S. 209 mitgeteilten Versuch war der Titer der Acetonlösung durch das Schütteln mit Silberoxyd, der ursprünglich 7,2 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung betragen hatte, auf 6,8 ccm heruntergegangen.)

Ganz anders ist das Verhalten von Acetaldehydlösungen bei dem eben geschilderten Verfahren. Zur Bestimmung des Acetaldehyds bediente ich mich der Ripperschen Methode, wobei ich den übergehenden Aldehyd in der früher von Embden geschilderten Weise direkt in überschüssiger titrierter Bisulfitlösung auffing[1]). 15 ccm einer Aldehydlösung, die 16,6 · 2,2 mg Acetaldehyd enthielten, wurden zunächst 5 Minuten unter Rückfluß, dann 15 Minuten am absteigenden Kühler destilliert. Gefunden wurden 0,6 · 2,2 mg. Die Zerstörung des Aldehyds war also keine ganz vollständige.

Erwärmt man aber die Aldehydlösung ganz langsam, vermeidet man durch Talkumzusatz jeden Siedeverzug und läßt 15 Minuten unter Rückfluß sieden, so gelingt es bereits bei einmaliger Anwendung des Silberoxydverfahrens, den Aldehyd bis auf ganz geringfügige Spuren zu zerstören. Ganz sicher erfolgt die Zerstörung, wenn man das in kaltem Wasser aufgefangene erste Destillat nochmals der Einwirkung des Silberoxyds unterzieht. Für die Zwecke der vorliegenden Untersuchung, in der es sich zunächst nur um den qualitativen Nachweis aldehydartiger Substanzen handelte, war das Überdestillieren unzerstörter Aldehydspuren ohne Belang.

Mischt man Aceton- und Aldehydlösungen von bekanntem Titer und unterwirft diese Mischung dem Silberoxydverfahren, so erhält man nach Messinger-Huppert Acetonwerte, die praktisch genau der zugesetzten Acetonmenge entsprechen. Auch ein sehr geringfügiger Gehalt des Destillates an unzerstörtem Acetaldehyd müßte die Acetonwerte zu hoch, eine durch die Anwesenheit von Acetaldehyd bedingte Mitzerstörung von Aceton die Werte zu niedrig erscheinen lassen. In einer Reihe von sechs Versuchen, bei der der Titer der zugesetzten Acetonlösung zwischen 16,6 und 19,3 ccm $^n/_{10}$-Jodlösung

---

[1]) Siehe Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 5, 1253.

schwankte und die Menge des zugesetzten Aldehyds sehr verschieden groß war, erreichte der titrierbare Acetonverlust nur in einem Falle 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-Jodlösung[1]).

Nach dem Gesagten gelingt es also leicht, in Flüssigkeiten, die nebeneinander Aceton und Acetaldehyd enthalten, den Aldehyd quantitativ zu zerstören, während das Aceton quantitativ erhalten bleibt.

Nimmt man in einem aus Durchblutungsblut gewonnenen Destillat eine Bestimmung nach Messinger-Huppert vor, so wird demzufolge, falls das Destillat nur Aceton enthielt, die gleiche Menge desselben Destillates nach der Anwendung des Silberoxydverfahrens bei der Bestimmung nach Messinger-Huppert genau die gleichen Werte geben, wie der sofort titrierte Destillatanteil. Enthielt das erste Destillat neben Aceton aber Acetaldehyd oder andere mit Wasserdampf flüchtige Substanzen von ähnlichem Verhalten, so muß sich das in einer Verringerung der nach Messinger-Huppert gewonnenen Titrationswerte nach Anwendung des Silberoxydverfahrens dartun.

Wenn auch, wie aus neueren Versuchen von v. Fürth und Charnaß[2]) hervorgeht, die quantitative Aldehydbestimmung nach dem Messinger-Huppertschen Prinzip im allgemeinen nicht gelingt, so darf man doch aus einer Verminderung der flüchtigen jodbindenden Substanz nach Anwendung des Silberoxydverfahrens schließen, daß aldehydartige Substanzen vorhanden waren.

Selbstverständlich ist es notwendig, das Vorhandensein flüchtiger, mit Silberoxyd zerstörbarer, nicht aldehydartiger Substanzen auszuschließen. In erster Linie könnten hier flüchtige Säuren in Betracht kommen, die man ohne weiteres beseitigen kann, wenn man das bei saurer Reaktion gewonnene erste

---

[1]) Gerade dieses Verhalten von Gemengen von Aceton und Acetaldehyd unterscheidet das eben geschilderte Verfahren sehr vorteilhaft von dem Friedmannschen, bei dem nach den Angaben dieses Forschers bei gleichzeitiger Anwesenheit von Aldehyd recht beträchtliche Mengen von Aceton mit zerstört werden. In einem der von ihm angeführten Versuche, in dem neben einer beträchtlichen Menge Acetaldehyd eine Menge Aceton vorhanden war, die 7,46 ccm $^{n}/_{10}$-Jodlösung entsprach, war dieser Titer nach fünfstündigem Schütteln mit Silberoxyd auf 6,03 ccm herabgegangen.

[2]) v. Fürth und Charnaß, diese Zeitschr. 26, 199, 1910.

Destillat aus dem Durchblutungsblut vor Anstellung der in Betracht kommenden Bestimmung aus alkalischer Lösung redestilliert. Jede Destillation an sich und, wie aus dem chemischen Verhalten der Aldehyde und insbesondere des Acetaldehyds leicht verständlich ist, namentlich jede Destillation aus alkalischer Lösung, führt allerdings, wie ich mich in eigens vorgenommenen Versuchen überzeugte, zu manchmal nicht ganz geringen Aldehydverlusten.

Wenn leicht flüchtige Aldehyde bei einer Durchblutung gebildet werden, so wird außerdem ein Teil durch den für die Arterialisierung des Blutes notwendigen Luft- oder Sauerstoffstrom fortgeführt werden. Mit der Untersuchung dieses Luftstromes auf Aldehyd habe ich mich noch nicht beschäftigt.

Aus alledem geht hervor, daß es sich in meinen Versuchen keineswegs um eine quantitative Bestimmung bei der Durchblutung auftretender, aldehydartiger Substanzen handelt, sondern nur um ihren qualitativen Nachweis, der allerdings für das Verständnis verschiedener Vorgänge in der künstlich durchbluteten Leber von wesentlicher Bedeutung zu sein scheint.

Ich habe nun zunächst die Frage geprüft: Bilden sich unter den von Embden und seinen Mitarbeitern gewählten Versuchsbedingungen bei der Durchströmung der normalen Leber mit Rinderblut ohne weiteren Zusatz merkliche Mengen flüchtiger, durch Kochen mit Silberoxyd zerstörbarer Substanz?

Drei zu diesem Zweck angestellte Versuche sind in Tab. I Versuche 1 bis 3, zusammengestellt.

In diesen wie in allen folgenden Versuchen erfolgte die Durchblutung mit 1600 ccm Rinderblut. Die Durchblutungsdauer betrug — ebenfalls in sämtlichen Versuchen dieser Arbeit — 60 Minuten. Auch hier wurde der modifizierte Mandelsche Apparat verwendet. Aus Kolonne 4 der Tab. I geht die Acetonbildung pro Liter hervor, die zufällig in allen drei Versuchen 19 mg betrug; aus Kolonne 5 ist ersichtlich, wieviel von dem nach Schenck erhaltenen Blutfiltrat, nachdem die üblichen Acetonbestimmungen ausgeführt waren, der Destillation unterworfen wurde. Das zunächst gewonnene Destillat wurde in den Versuchen 1 und 2 nach dem Alkalisieren durch Zusatz einiger Tropfen Natronlauge redestilliert. In Versuch 3 wurde das bei saurer Reaktion gewonnene Destillat direkt

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Von dem Blutfiltrat wurden destilliert ccm	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösung in dem ohne Silberoxyd destill. Anteil	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösung in dem mit Silberoxyd destill. Anteil
1	140	—	19	3000 (alkalisch redestilliert)	5,0	4,95
2	245	—	19	3000 (alkalisch redestilliert)	6,4	6,3
3	205	—	19	2000 (keine alkal. Redestill.)	4,4	4,3

weiterverarbeitet. Ein annähernd der Hälfte des gewonnenen Gesamtdestillates entsprechender, gemessener aliquoter Teil wurde unter Zusatz von etwas Talkum redestilliert, wobei ebenso wie bei der ersten Destillation das Destillat in einer eisgekühlten Vorlage, die 150 ccm Wasser enthielt, aufgefangen wurde. Ein genau gleich großer Teil des Destillats wurde mit frisch gefälltem feuchten Silberoxyd und Talkum versetzt, um zunächst 15 Minuten unter Rückflußkühlung, alsdann längere Zeit am absteigenden Kühler destilliert zu werden. In den Kolonnen 6 und 7 ist die Zahl der Kobikzentimeter $^n/_{10}$-Jodlösung angegeben, die nach der Redestillation ohne Silberoxyd (Kolonne 6) und mit Silberoxyd (Kolonne 7) gebunden wurden. Ein Vergleich der Kolonnen 6 und 7 lehrt, daß hier nur ganz geringfügige Unterschiede bestehen, die an sich innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung, allerdings alle in derselben Richtung, gelegen sind. Die nach der Destillation mit Silberoxyd gewonnenen Werte sind um 0,05 bis 0,1 ccm geringer als die ohne Silberoxydzusatz erhaltenen.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten Friedmanns, der in zwei Durchblutungsversuchen an der normalen Leber fand, daß ganz erhebliche Mengen bei seinem Verfahren mit Silberoxyd zerstörbarer, flüchtiger jodbindender Substanzen auftraten[1]).

[1]) E. Friedmann, l. c., S. 207, Tab. III, S. 212.

Ob dieser Unterschied lediglich dadurch bedingt ist, daß, wie oben erwähnt, bei dem Friedmannschen Verfahren des Schüttelns mit Silberoxyd merkliche Mengen Aceton in Verlust geraten, oder ob noch andere Ursachen für den Widerspruch zwischen Friedmanns und meinen Versuchen vorhanden sind, will ich hier nicht erörtern. Jedenfalls geht aber, glaube ich, aus meinen Versuchen hervor, daß bei der Durchblutung der normalen Leber unter den von Embden gewählten Versuchsbedingungen ohne Zusatz acetessigsäurebildender Substanzen eine merkliche Menge aldehydartiger Substanzen nicht gebildet wird.

Ich bin nunmehr zur Untersuchung der Frage übergegangen, ob bei Zusatz verschiedenartiger acetessigsäurebildender Substanzen neben der Acetessigsäure aldehydartige Körper auftreten.

Meine Versuche erstrecken sich zunächst nur auf einige wenige Substanzen.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter	Von dem Blutfiltrat wurden destilliert ccm	Gebundene Menge n/10-Jodlösg. in dem ohne Silberoxyd destillierten Anteil	Gebundene Menge n/10-Jodlösg. in dem mit Silberoxyd destillierten Anteil
4	170	2 g Isovaleriansäure, mit Ammoniak neutralisiert	77	1200 (mehrmals destill., jedoch ohne Alkalizusatz)	5,5	5,7
5	155	do.	63	viermal je 500	5,8 5,9	5,8 5,9
6	130	do.	59	4000 (nicht alkalisch redestilliert)	17,7	17,6
6a	339	10 ccm acetessigsaures Natrium, entsprechend 1,38 g Acetessigsäure, in 100 ccm Kochsalz von 0,85 % gelöst	A 494 B_1 188 (B_2 176)	1300	20,5	20,4

In Tab. II sind drei Versuche mit je 2 g Isovaleriansäure wiedergegeben. Die Acetonbildung pro Liter war in den Versuchen 4, 5 und 6 gleich 77, 63 und 59 mg, entsprechend der

früheren Erfahrung, daß Isovaleriansäure ein kräftiger Acetessigsäurebildner ist. In Versuch 4 wurden 1200 ccm mehrmals destilliert, ohne daß Alkalizusatz erfolgte. Von dem schließlich gewonnenen Destillat wurden zwei möglicht große gleiche Teile abgemessen und der eine Teil ohne Silberoxyd, der andere mit Silberoxyd nochmals destilliert. Ein Blick auf die Kolonnen 6 und 7 der Tab. II, Versuch 4 lehrt, daß in dem mit Silberoxyd behandelten Anteil des Destillats 5,7 ccm, in dem ohne Silberoxyd destillierten 5,5 ccm $^{n}/_{10}$-Jodlösung gebunden waren, also innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung die gleiche Menge. Das gleiche zeigt Versuch 5, wo von dem Filtrat 4mal je 500 ccm destilliert wurden. Zwei der gewonnenen Destillate wurden mit, zwei ohne Silberoxyd redestilliert. Die sämtlichen vier gewonnenen Werte stimmen untereinander überein.

Dasselbe Verhalten zeigt auch Versuch 6, wo das Destillat aus 4000 ccm Filtrat für die Destillation mit und ohne Silberoxyd verwendet wurde. Die gewonnenen Werte sind 17,7 und 17,6, stimmen also miteinander überein. Sonach werden also bei der Durchströmung mit Isovaleriansäure ebensowenig wie in Leerversuchen nachweisbare Mengen flüchtiger jodbindender, mit Silberoxyd zerstörbarer Substanz gebildet.

In Versuch 6a derselben Tabelle erfolgte die Durchströmung unter Zusatz einer Lösung von acetessigsaurem Natrium, deren Acetessigsäuregehalt nicht ganz 1,4 g betrug. In Kolonne 4 ist der „Aceton"gehalt eines Liters Durchblutungsblut vor der Durchblutung unter A mit 494 mg verzeichnet. Dieselbe Blutmenge enthielt nach der Durchblutung nur noch 188 mg Aceton, auf Grund der Titration nach Redestillation aus alkalischer Lösung 176 mg. Die Anwendung des Silberoxydverfahrens zeigte auch hier, daß aldehydartige Substanzen sich bei der Durchblutung nicht gebildet hatten.

In der Tab. III sind 5 Versuche mit je 6 g Zuckersäure wiedergegeben, die sich in früher von J. Wirth[1]) im hiesigen Institut angestellten Versuchen als ein kräftiger Acetessigsäurebildner erwiesen hat.

---

[1]) J. Wirth, Abbau von Kohlenhydratsäuren in der Leber. Diese Zeitschr. 33, 49, 1911.

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter	Von dem Blutfiltrat wurden destilliert ccm	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösg. in dem ohne Silberoxyd destillierten Anteil	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösg. in dem mit Silberoxyd destillierten Anteil	Bemerkungen
7	220	6 g Zuckersäure, mit Ammoniak neutralisiert	**221** (216)	je 500	**19,2**	19,0 18,9 18,95	Die eingeklammerten Zahlen in Kolonne 4 sind gewonnen durch Titration nach alkal. Redestillation. Das nicht mit Ag_2O behandelte Destillat alkal. redestilliert.
8	169	do.	**113** (107)	je 500	9,7	8,8	Für diesen Versuch gilt dieselbe Bemerkung wie für Versuch Nr. 7.
9	165	do.	**104**	3000	27,5	26,5	24 Std. nach dem Versuch banden die Destillate aus je 500 ccm Filtrat einfach destilliert 9,0 ccm $^n/_{10}$-Jod, erst sauer, dann alkal. destilliert 9,0 bzw. 9,1 ccm.
10	155	do.	**43** (37)	3000	**10,0**	9,5	
11	260	do.	**67** (66)	3000	**17,3**	16,9	In den Versuchen 9 bis 11 wurden die aus den in Kolonne 5 ersichtlichen Filtratmengen nicht alkalisch destilliert.

Betrachten wir zunächst die nicht eingeklammerten Zahlen der Kolonne 4 dieser Tabelle, so finden wir eine zwischen 43 und 221 mg pro Liter schwankende Acetessigsäurebildung. In der genannten Kolonne finden sich unter den eben erwähnten fett gedruckten Zahlen — mit Ausnahme von Versuch 9 — eingeklammerte Zahlen, die alle etwas niedriger sind als die fett gedruckten. Diese Zahlen sind gewonnen durch alkalische Redestillation des ersten, bei saurer Reaktion erhaltenen Destillates. Offenbar tritt also bei der Durchströmung mit Zuckersäure eine flüchtige, jodbindende Substanz auf, die durch Alkali zurückgehalten wird und über deren Natur ich zunächst keinerlei Vermutung aussprechen möchte.

In den Versuchen 7 und 8 der Tab. III sind die für die Anwendung des Silberoxydverfahrens bestimmten Destillate und die Kontrollversuche ohne Silberoxyd alkalisch redestilliert. In Versuch 7 ist zwischen dem Kontrollversuch und dem Silberoxydversuch kein oder wenigstens kein deutlicher Unterschied

vorhanden. In Versuch 8 dagegen findet sich ein Unterschied von nahezu 1 ccm (9,7 ccm ohne Silberoxyd, 8,8 ccm mit Silberoxyd).

In weniger einwandfreier Weise sind, soweit es sich um das Silberoxydverfahren handelt, leider die Versuche 9 bis 11 dieser Tabelle angestellt. Hier sind nämlich die sauer gewonnenen Destillate, bevor sie dem Silberoxydverfahren bezüglich der Kontrolldestillation unterzogen wurden, nicht alkalisch redestilliert. Ich möchte daher für die Frage des Auftretens aldehydartiger Substanzen den mehr oder weniger deutlich ausgesprochenen Unterschieden zwischen Kontrolldestillation und Silberoxyddestillation in diesen Versuchen keine entscheidende Bedeutung beimessen, da nach den eben besprochenen Ergebnissen der Kolonne 4 bei der Durchströmung mit Zuckersäure sehr möglicherweise flüchtige, jodbindende Substanzen saurer Natur auftreten.

Ich komme nunmehr zur Besprechung von 8 Durchblutungsversuchen mit Äthylalkohol, deren Ergebnisse mir nicht nur für die Frage des Auftretens aldehydartiger Substanzen bei der Leber von Interesse zu sein scheint (Tabelle IV). Die Mengen des in diesen Versuchen zugesetzten Äthylalkohols sind aus der Kolonne 3 ersichtlich.

Betrachten wir zunächst die Kolonne 4, welche die Acetonbildung pro Liter angibt, so sehen wir, daß in 5 von den angestellten 8 Versuchen die Acetonbildung gegenüber der Norm vermehrt ist, und zwar in den Versuchen 12, 13 und 18 sehr stark (82, 83 und 78 mg pro Liter), aber auch in den Versuchen 15 und 16 ganz deutlich (50 und 43 mg pro Liter). Von den drei übrigen Versuchen zeigen Nr. 14 und 17 Werte von 35 und 37 mg, welche immerhin über den bei der Durchblutung ohne Zusatz beobachteten Maximalwert von 27 mg etwas hinausgehen. Von sämtlichen 8 Versuchen in dieser Tabelle hält sich nur Versuch 19 innerhalb der Normalwerte (Acetonbildung pro Liter 27 mg).

Bis auf Versuch 14 wurde neben der Titration des direkt bei saurer Reaktion gewonnenen Destillats eine solche nach alkalischer Redestillation ausgeführt. Wie aus sämtlichen Versuchen, im Gegensatz zu den eben besprochenen Erfahrungen bei der Zuckersäure, übereinstimmend hervorgeht, sind hier

Tabelle IV.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter	Von dem Blutfiltrat wurden destilliert ccm	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlösg. in dem ohne Silberoxyd redestillierten Anteil	Gebundene Menge $^n/_{10}$-Jodlö g. in dem mit Silberoxyd redestillierten Anteil	Bemerkungen
12	165	2,5 ccm Äthylalkohol in 50 ccm Kochsalzlösung von 0,85 %	**82** (82)	3000 (nicht alkaisch redestilliert)	19,05	18,10	Neugebildete Menge Aceton aus Acetessigsäure 58 mg pro Liter
13	150	3 ccm Äthylalkohol in 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 %	**83** (83)	do.	21,2	20,15	Neugebildete Menge Aceton aus Acetessigsäure 62 mg
14	140	4,5 ccm Äthylalkohol in Kochsalzlösung von 0,85 %	**35**	2000 (nicht alkalisch redestilliert)	6,8	6,0	—
15	140	3 ccm Äthylalkohol in 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 %	**50** (50)	4000 (nicht alkalisch redestilliert)	16,35	13,40	—
16	160	do.	**43** (42)	do.	12,5	10,9	—
17	140	3 ccm Äthylalkohol auf 75 ccm Kochsalzlösung von 0,85 %	**37** (36)	3000 (nicht alkalisch redestilliert)	9,8	8,8	—
18	290	5 ccm Äthylalkohol auf 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 %	**78** (77)	3500 (nicht alkalisch redestilliert)	23,6	19,95	—
19	188	4 ccm Äthylalkohol in 100 ccm Kochsalzlösung von 0,85 %	**27** (27)	4000	10,2	8,2	—

zwischen den direkt ermittelten und zwischen den nach alkalischer Reaktion erhaltenen Werten entweder überhapt keine oder keine außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung liegenden Unterschiede vorhanden. Wir dürfen danach das Auftreten flüchtiger, jodbindender Säure bei der Durchströmung mit Äthylalkohol ausschließen.

Die weitere Besprechung der Äthylalkoholversuche wird wesentlich erleichtert, wenn wir zunächst unsere Aufmerksam-

keit auf die Kolonnen 6 und 7 der Tabelle IV richten. Überall sehen wir hier zwischen den Silberoxyd- und zwischen den Kontrolldestillationen ganz deutliche und zum Teil außerordentlich starke Unterschiede. Nur in wenigen Bestimmungen ist dieser Unterschied merklich geringer als 1 ccm, in mehreren Fällen sehr viel größer, so in Versuch 16 gleich 1,6 ccm, in Versuch 19 gleich 2 ccm und in Versuch 18 gar 3,65 ccm.

Ich möchte besonders darauf aufmerksam machen, daß die Anwesenheit vom Alkohol die jodometrische Bestimmung unter den in Frage kommenden Bedingungen (kurzes Stehen sehr stark verdünnter Lösungen bei etwa 5 bis 10°) nicht oder jedenfalls nicht merklich beeinflußt.

Daß in diesen Versuchen vor der Anstellung der Silberoxyddestillation eine alkalische Redestillation nicht erfolgte, ist für die Beurteilung der Versuche ohne Belang, denn, wie bereits oben erwähnt, waren hier flüchtige, jodbindende Säuren nicht vorhanden. Es wird sehr erwünscht sein, gerade in den Versuchen mit Äthylalkohol die Natur der sicher nicht säureartigen silberoxydempfindlichen Substanz einwandfrei festzustellen. Aber in Anbetracht der chemischen Struktur des Äthylalkohols und im Zusammenhalt mit der Tatsache, daß sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle Äthylalkohol als Acetessigsäurebildner erwies, sowie unter Berücksichtigung des Befundes von Friedmann, daß Acetaldehyd oder wenigstens Acetaldehydammoniak Acetessigsäure bildet, glaube ich doch die Vermutung aussprechen zu dürfen, daß die mit Silberoxyd zerstörbare, jodbindende Substanz nichts anderes war als Acetaldehyd.

Wenn Äthylalkohol bei der Durchblutung der Leber die Acetessigsäurebildung steigert, und, was ich für höchstwahrscheinlich halte, die Acetessigsäure wirklich ein Umwandlungsprodukt des Äthylalkohols ist, so erfolgt diese Acetessigsäurebildung aller Voraussicht nach unter intermediärer Bildung von Acetaldehyd und Aldolkondensation

$$\text{I. } CH_3CH_2OH + O = CH_3C\langle{}^{O}_{H} + H_2O$$

$$\text{II. } 2\ CH_3C\langle{}^{O}_{H} \rightarrow CH_3CHOHCH_2C\langle{}^{O}_{H}$$

in ganz ähnlicher Weise wie Friedmann[1]) es für Acetaldehydammoniak in der durchbluteten Leber nachwies. Gerade mit einigen Ergebnissen des letztgenannten Autors steht nun aber mein Befund, daß Äthylalkohol in der künstlich durchbluteten Leber ein Acetessigsäurebildner ist, in scheinbarem Widerspruch. Friedmann[1]) hat nämlich zwei Versuche mit ganz ähnlichen Mengen Äthylalkohol, wie sie auch in meinen Versuchen zur Verwendung kamen, angestellt, und zwar mit völlig negativem Ergebnis. Wie dieser Unterschied zu erklären ist, ist einstweilen schwer zu entscheiden. Ich möchte aber darauf hinweisen, daß auch einer von meinen Versuchen negativ, zwei andere höchstens schwach positiv waren.

Bei den „Acetonbestimmungen“, die der Berechnung der Acetonbildung pro Liter Durchblutungsblut (Kolonne 4) zugrunde liegen, wurde die mit Silberoxyd zerstörbare flüchtige Substanz als Aceton mit in Rechnung gezogen. Dadurch erschienen die Werte der Kolonne 4 etwas zu hoch, ohne daß die Versuchsergebnisse im wesentlichen beeinflußt werden.

Auch in den Versuchen, wo die Acetessigsäurebildung ausblieb, war offenbar Aldehydbildung eingetreten, wie aus den Kolonnen 6 und 7 hervorgeht.

Die Aldolkondensation von primär aus Äthylalkohol und vielleicht auch aus anderen Substanzen gebildetem Acetaldehyd unter nachfolgender Umwandlung zu Acetessigsäure, ist offenbar nur eine von verschiedenen möglichen Reaktionen. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird Acetaldehyd nicht nur im Gesamtorganismus, sondern auch in der isolierten Leber oxydiert werden können zu Essigsäure und im Sinne des schließlichen Abbaus dürfte die Essigsäurebildung aus Acetaldehyd und damit auch aus Äthylalkohohl die „Hauptreaktion“ darstellen. Die Bedingungen, unter denen Acetaldehyd bei der Leberdurchblutung mehr oder weniger stark den „Seitenweg“ zur Aldolkondensation beschreitet, sind noch nicht aufgeklärt. Das ändert aber nichts daran, daß nicht nur dem Blut von vornherein zugesetzter Acetaldehyd, sondern auch intermediär aus Äthylalkohol gebildeter diesen Wege beschreiten kann[2]).

[1]) E. Friedmann, l. c.

[2]) Selbstverständlich ist die Voraussetzung für die Acetessigsäurebildung aus Alkohol, daß der Alkohol in der durchbluteten Leber über-

Die Umwandlung von Alkohol in Acetessigsäure (und damit sicher auch in β-Oxybuttersäure) steht vielleicht in enger Beziehung zur Fettsäure- und Fettbildung aus Alkohol im Tierkörper.

Die klinischen Erfahrungen an Zuckerkranken haben nun des öfteren gerade in Fällen von Acidosis keinen ungünstigen, sondern im Gegenteil einen recht günstigen Einfluß der Alkoholdarreichung gezeigt. Das spricht nun keineswegs dagegen, daß Alkohol im tierischen Organismus und auch in dem des Zuckerkranken Acetonkörper bilden kann, sondern es spricht nur dafür, daß die Umwandlung des Alkohols in Acetonkörper nicht die Hauptreaktion darstellt. Wenn man Alkohol an Zuckerkranke mit Acidosis verabreicht, so wird voraussichtlich bei weitem die Hauptmenge verbrannt. Der leicht verbrennliche Alkohol verhindert acetonbildende Substanzen an der Verbrennung ganz im Sinne der in einer früheren Arbeit von Embden und Wirth[1]) entwickelten Anschauung.

Die wohl auch im Organismus der Zuckerkranken auftretende Acetonkörperbildung aus dem verabreichten Alkohol selbst tritt ihrem Umfange nach offenbar hinter der Hemmung der Acetonkörperbildung aus anderen Substanzen zurück.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind folgende:

1. Durch das von mir beschriebene Silberoxydverfahren gelingt es, Aceton neben Acetaldehyd quantitativ zu be-

---

haupt merklich angegriffen wird. Dies ist nun in der Tat in hohem Maße der Fall. In mehreren eigens angestellten Durchblutungsversuchen unter Zusatz von ähnlichen Mengen von Äthylalkohol, wie sie in den eben geschilderten Versuchen zur Verwendung kamen, und unter Berücksichtigung des Verlustes an Äthylalkohol durch seine Flüchtigkeit während der Durchblutung konnte gezeigt werden, daß jedenfalls mehr als 50% des zugesetzten Alkohols während einer 1 stündigen Leberdurchblutung verschwindet. Die bei diesen Versuchen eingehaltene Alkoholbestimmungsmethode im Durchblutungsblut vor und nach der Durchblutung ist in der auf diese folgende Arbeit von Embden und Baldes geschildert. Besonders hervorgehoben sei noch, daß Anhaltspunkte dafür, daß der verschwindende Alkohol sich etwa durch Veresterung oder sonstige Paarung dem Nachweis entzogen hätte, nicht gewonnen werden konnten.

[1]) G. Embden und J. Wirth, diese Zeitschr. 27, 1.

stimmen und die Anwesenheit auch geringer Mengen aldehydartiger Substanzen in einer acetonhaltigen Flüssigkeit nachzuweisen.

2. Die Anwendung dieser Methode auf Leberdurchblutungsversuche hatte folgendes Ergebnis:

a) Bei Durchströmung der normalen glykogenarmen Hundeleber mit Rinderblut ohne Zusatz treten nachweisbare Mengen aldehydartiger Substanzen nicht auf.

b) Das gleiche ist der Fall bei Durchströmung mit dem Acetessigsäurebildner Isovaleriansäure und mit Acetessigsäure selber.

c) Nach Durchströmung mit der ebenfalls stark acetessigsäurebildenden d-Zuckersäure lassen sich im Blutdestillat neben Aceton flüchtige, jodbindende Substanzen nachweisen, die durch Silberoxyd leicht zerstörbar sind. Die Natur dieser Substanzen ist noch nicht festgestellt.

d) In besonders hohem Maße treten derartige Substanzen bei der Durchströmung mit Äthylalkohol auf.

3. Äthylalkohol kann bei der künstlichen Durchströmung der Leber Acetessigsäure bilden. Aller Wahrscheinlichkeit nach erfolgt diese Acetessigsäurebildung durch Aldolkondensation von primär entstandenem Acetalaldehyd.

Die unter 2. d) genannte Substanz dürfte nichts anderes als Acetaldehyd sein.

Über Umwandlung von Acetaldehyd in Äthylalkohol im tierischen Organismus.

Von

Gustav Embden und Karl Baldes.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Durch Masuda[1]) konnte in der voranstehenden Arbeit dargetan werden, daß Äthylalkohol in der künstlich durchbluteten Leber Acetessigsäure bildet, augenscheinlich unter intermediärem Auftreten von Acetaldehyd, von dem bereits früher E. Friedmann[2]) gezeigt hatte, daß er die Acetessigsäurebildung in der Leber zu steigern vermag.

Wenn also nach den Ergebnissen von Masuda Äthylalkohol in der durchbluteten Leber Acetaldehyd bildet, so suchten wir in der vorliegenden Arbeit die Frage zu entscheiden, ob umgekehrt durch lebensfrischen Organbrei und in der durchströmten Leber Acetaldehyd in Äthylalkohol übergeht.

Freilich durfte ein derartiges Verhalten auf Grund neuerer Untersuchungen von Batelli und Stern[3]), in denen die Umwandlung von Acetaldehyd in Äthylalkohol und Essigsäure sehr wahrscheinlich gemacht wurde, und mehr noch auf Grund einer Arbeit von J. Parnas[4]), erwartet werden, der fand, daß der Übergang verschiedener aliphatischer Aldehyde in die entsprechenden Alkohole und Säuren nach dem Typus der Canniza-

---

[1]) Niro Masuda, diese Zeitschr. **45**, 140, 1912.

[2]) E. Friedmann, Zur Kenntnis des Abbaus der Carbonsäure im Tierkörper. V. Mitteilung. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., **11**, 202, 1908.

[3]) Batelli und Stern, Bull. de Soc. Biol. **1910**.

[4]) J. Parnas, Fermentative Beschleunigung der Cannizaroschen Aldehydumlagerung. Diese Zeitschr. **28**, 274, 1910.

roschen Umlagerung durch ein in der Leber vorhandenes lösliches Ferment — die Aldehydmutase — beschleunigt wird.

Wenn wir dennoch gerade am Acetaldehyd derartige Versuche nochmals ausführten, so geschah es im Hinblick darauf, daß der tierische Organismus anscheinend geringe Mengen Äthylalkohol zu bilden vermag.

Wenn Acetaldehyd im tierischen Organismus in Äthylalkohol umgewandelt wird, so würde das den Gedanken nahelegen, daß auch die geringen in tierischen Geweben nachweisbaren Alkoholmengen auf dem Wege über Acetaldehyd entstehen, daß Acetaldehyd also ein normales intermediäres Stoffwechselprodukt sein könnte.

Ihre volle biologische Bedeutung würden unsere Versuche, die durchaus positiv ausgefallen sind, erst dann gewinnen, wenn für das Auftreten von Acetaldehyd im normalen intermediären Stoffwechsel der strenge Beweis erbracht werden könnte.

Diesem Ziele kommt, wie wir glauben, eine der nachstehenden Arbeiten außerordentlich nahe[1]).

Methodisches.

Wir führten unsere Versuche zum Teil an Organbrei, zum Teil an der durchbluteten Leber aus. Es wurde der größte Wert darauf gelegt, daß der Organbrei so rasch wie möglich nach dem Tode des Versuchstieres zur Anwendung kam, wenngleich aus den bereits erwähnten Versuchen von Parnas hervorgeht, daß die Beschleunigung der Cannizaroschen Umlagerung nicht wie die Umwandlung von Acetessigsäure in β-Oxybuttersäure an die Lebensfrische des Organbreis gebunden ist.

Unsere Versuche werden im übrigen ganz ähnlich wie diejenigen von Embden und Michaud[2]) ausgeführt. Das Versuchstier (wir wandten bisher ausschließlich Hunde an) wurde in leichter Äthernarkose durch Entbluten aus beiden Femoralarterien getötet. Die rasch entnommene Leber wurde mit einer Hackmaschine fein zerhackt, der Leberbrei durch Rühren gemischt

---

[1]) Gustav Embden und Max Oppenheimer, diese Ztschr., **45**, 186, 1912.

[2]) G. Embden und L. Michaud, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 332, 1908.

und gleiche aliquote Teile davon abgewogen. Der zur Untersuchung auf Alkoholbildung aus Acetaldehyd bestimmte Teil wurde mit dem gleichen Volumen körperwarmer Kochsalzlösung von 0,85 % in eine hermetisch verschließbare Pulverflasche übergeführt, mit Acetaldehydlösung versetzt und blieb dann 30 bis 40 Minuten im Wasserbade von 40° stehen.

Der sofort auf seinen Alkoholgehalt zu untersuchende Anteil wurde mit dem seinem Gewicht entsprechenden Volumen kalten Wassers, dem doppelten Volumen Salzsäure von 2 %, der gleichen Menge derselben Aldehydlösung, wie sie zu Versuch B verwandt wurde, in der eben angegebenen Reihenfolge versetzt und schließlich die Fällung durch Hinzufügung des dem zugesetzten Salzsäurevolumens gleichen Volumen Quecksilberchoridlösung von 5 % vollendet.

Die Aldehydlösungen wurden in verschiedener Weise dargestellt. Zum Teil gingen wir vom reinsten, bei Kahlbaum käuflichen Präparate aus, das wir durch fraktionierte Destillation reinigten. Zum Versuche benutzten wir nur den von 21 bis 23° siedenden Anteil. In der Mehrzahl unserer Versuche wurden die Aldehydlösungen in etwas anderer und, wie wir glauben, noch einwandfreierer Weise hergestellt. Wir stellten in üblicher Weise Aldehydammoniak jedesmal frisch dar, lösten dieses in etwas Wasser und setzten den Aldehyd aus der Ammoniakverbindung durch vorsichtiges Neutralisieren mit Salzsäure in Freiheit.

Die so gewonnene Lösung wurde direkt verwendet. Der hierdurch erfolgte geringe Zusatz von Ammoniumchlorid zu unseren Versuchen ist offenbar ohne Belang.

Die Bestimmung B wurde nach dem Aufenthalte im Wasserbade von 40° sofort mit Salzsäure und Sublimat in derselben Weise wie die Bestimmung A gefällt und ebenso, wie das auch mit A geschehen war, fest verschlossen im Eisschrank abgekühlt. Die weitere Verarbeitung wurde frühestens nach einigen Stunden begonnen. Gleiche, gemessene, aliquote Mengen des Filtrates von A und B wurden bis auf die Hälfte ihres Volumens abdestilliert. Wir haben uns in vielen Versuchen davon überzeugt, daß bei unserer Art des Destillierens bei den in Betracht kommenden Alkoholmengen das Abdestillieren auf die Hälfte genügt.

Wir bedienten uns bei unseren Versuchen eines einfachen kleinen Apparates, der untenstehend abgebildet ist. (Fig. 1.)

Ein Rundkolben *A* ist mittels Gummistopfen mit einem Schlangenkühler *B* verbunden. Außer der für das Rohr des Rückflußkühlers bestimmten Bohrung hat der Gummistopfen noch eine zweite Bohrung für den Glashahn *C*. Der Rückflußkühler ist an seinem oberen Ende mittels Gummistopfen mit dem einen Ende einer zweimal rechtwinklig gebogenen Glasröhre *D* verbunden, die an ihrem anderen Ende durch einen zweiten Schlangenkühler *E* in einen Rundkolben *F*, der kleiner ist als der Rundkolben *A*, führt. Der den Rundkolben *F* verschließende Gummistopfen trägt wiederum eine Bohrung für den Glashahn *G*.

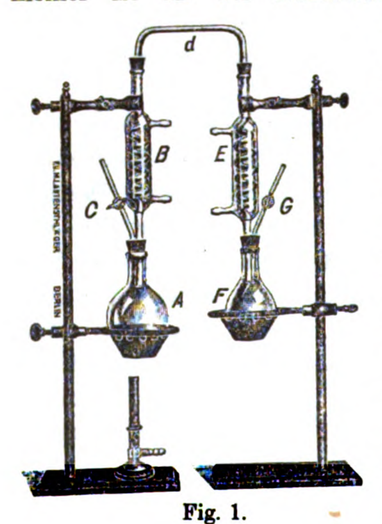


Fig. 1.

Die Handhabung des Apparates ist überaus einfach. Bei der ersten Destillation, die aus dem Kolben *A* in den als Vorlage dienenden Kolben *F* erfolgt, wird dem Filtrat nur etwas Talkum hinzugefügt. Der Glashahn *C* ist natürlich verschlossen, der Glashahn *G* geöffnet. Das Kühlwasser aus dem Kühler *B* wird vor Beginn der Destillation abgelassen, während der Kühler *E* in Betrieb ist. Zur Vervollständigung der Kühlung steht der Kolben *F* in Eis. Der Kolben *F* enthält etwas Talkum und eine nicht zu geringe Menge feuchtes Silberoxyd und trägt außen eine Marke, die das überzudestillierende Volumen angibt. Die Destillation darf nicht zu rasch erfolgen. Das Schlangenrohr des Kühlers *B* wirkt übrigens bis zu einem gewissen Grade wie ein Fraktionieraufsatz. Das Sieden darf nie so stark werden, daß das Zurücktropfen von Kondenswasser aus dem Kühler *B* ganz aufhört.

Die zuerst verarbeitete Filtratmenge betrug meist etwa 400 bis 500 ccm, so daß nach den eben gemachten Angaben bei dieser ersten Destillation 200 bis 250 ccm überdestilliert werden mußten.

Die Destillationsdauer betrug etwa 45 bis 60 Minuten, was wir für etwaige Nachprüfungen unserer Versuche besonders erwähnen.

Nach Beendigung der Destillation wird der Hahn *G* geschlossen, der Hahn *C* geöffnet und der Kolben *A* gegen einen kleineren auf denselben Stopfen passenden Kolben ausgewechselt, der wiederum etwas frisch gefälltes feuchtes Silberoxyd und ein wenig Talkum enthält.

Nunmehr wird der Kolben *F* geheizt, während sowohl der Kühler *E* wie der Kühler *B* in Tätigkeit sind. Der als Vorlage dienende Kolben steht hier und bei allen folgenden Destillationen wieder in Eis. Die im Kolben *F* befindliche Flüssigkeit wird zunächst zur Zerstörung des Aldehyds durch Oxydation mittels des Silberoxyds 15 Minuten unter Rückfluß in gelindem Sieden gehalten, dann wird der Kühler *E* abgestellt und das Kühlwasser abgelassen. Die nachfolgende Destillation in die Vorlage *A* darf wiederum nicht zu rasch erfolgen. Nach ihrer Beendigung wird genau in der eben geschilderten Weise die Destillation unter Silberoxydzusatz und anfänglichem Sieden unter Rückflußkühlung ein- oder besser zweimal wiederholt. Sowohl nach den früher geschilderten Erfahrungen von Masuda wie nach unseren eigenen Versuchen gelingt es auf diese Weise sehr leicht, den Acetaldehyd ganz vollständig zu zerstören. Freilich scheint es nach einer noch unveröffentlichten Untersuchung von Frau Dr. Wittenberg, als ob auch Äthylalkohol im Gegensatz zu Aceton beim Kochen mit Silberoxyd in allerdings sehr geringem Grade allmählich zerstört wird. Wir raten daher davon ab, das Silberoxyd mehr als dreimal einwirken zu lassen und die jedesmalige Dauer des Destillierens unter Rückflußkühlung auf über 15 Minuten auszudehnen.

Die von uns gewählte Art der Destillation hat den großen Vorteil, daß jedes Überspülen des Destillates und jedes Ausspülen der Kühler in Wegfall kommt. Die Vorlagen, die bei den späteren Destillationen nur etwas Talkum enthalten, werden natürlich immer kleiner.

Die letzte Destillation erfolgt zweckmäßig in einem kleinen eisgekühlten Meßzylinder. Von dem letzten Destillate haben wir einen mit der Pipette abgemessenen aliquoten Teil — meist etwa die Hälfte — zur Alkoholbestimmung nach Zeisel-Fanto mittels des von Stritha angegebenen Apparates benutzt.

Wir wollen erwähnen, daß uns eine größere Zahl an verdünnten Lösungen reinen Äthylalkohols angestellten Versuchen gelehrt haben, daß bei der von uns angewandten Destillationsart Alkohol nicht verloren geht, wobei aber nochmals darauf hingewiesen sei, daß die durch gleichzeitige Anwesenheit von Aldehyd bedingte Notwendigkeit des Kochens mit Silberoxyd anscheinend zu geringen Alkoholverlusten führt[1]).

Wie wir bereits oben erwähnten, wurden unsere Versuche zum Teil an Organbrei, zum Teil an der künstlich durchbluteten Leber angestellt. Als Organbrei diente uns fast ausschließlich Leberbrei, nur in einigen wenigen Versuchen kam Nierenbrei zur Anwendung.

In Tabelle I (Versuche 1 bis 8) sind die Versuche mit Leberbrei zusammengestellt.

Aus den Kolonnen 2 bis 5 dieser Tabelle sind die notwendigen Angaben über die Ausführung der Versuche ersichtlich. Kolonne 2 gibt die Menge des für jeden einzelnen Versuch verwendeten Leberbreies in Gramm an, Kolonne 3 die jedem einzelnen Versuche zugesetzte Aldehydmenge in Gramm und Prozenten des angewandten Leberbreies, Kolonne 4 die Anzahl Minuten, die die Bestimmung B im Wasserbade von 40° blieb, während Kolonne 5 über den zur Destillation benutzten aliquoten Teil des Filtrates Aufschluß gibt. Es sei hier daran erinnert, daß nach den oben gemachten Angaben das gewonnene Filtrat einer sechsfachen Leberverdünnung entspricht. Die Ergebnisse der Alkoholbestimmungen gehen ohne weiteres aus den Kolonnen 6 bis 13 hervor. Die Kolonnen 6 und 8 geben die auf die Gesamtdestillatmenge des verarbeiteten Filtrates A und B berechnete Menge Jodsilber in Gramm an.

In den Kolonnen 7 und 9 sind die Zahlen der Kolonnen 6 und 8 auf Alkohol umgerechnet. Wie ein Vergleich der Kolonnen 7 und 9 ergibt, ist in allen Fällen die Alkoholmenge

---

[1]) Ein Mißstand des von uns angewandten Doppeldestillationsapparates besteht darin, daß die Gummistopfen sich ziemlich rasch abnutzen. Wir haben daher neuerdings die Firma F. u. M. Lautenschläger veranlaßt, den Apparat unter ausschließlicher Anwendung von Glasschliffen, die alle aufeinanderpassen, auszuführen. Als letzte, ebenfalls durch Schliff mit dem Apparate verbundene Vorlage dient hierbei ein zylindrisches Meßgefäß.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nr. des Versuchs	Für jeden Einzelversuch verwandte Menge Leberbrei g	Jedem Einzelversuch zugesetzte Aldehydmenge in Gramm u. Prozenten der Leberbreimenge	Versuch B wurde verarbeitet nach einem Aufenthalte im Wasserbade von 40° von Min.	Von jedem Einzelversuch verarbeitete Filtratmenge ccm	Auf das Gesamtdestillat aus dieser Filtratmenge berechnete Menge Jodsilber für A g	Daraus berechnete Menge Alkohol g	Auf das Gesamtdestillat aus der in Kolonne 5 genannten Filtratmenge berechnete Menge Jodsilber für B g	Daraus berechnete Menge Alkohol g	Alkoholmenge in der Gesamtflüssigkeit A g	Alkoholmenge in der Gesamtflüssigkeit B g	Gesamtzunahme des Alkohols g	Alkoholbildung aus dem Aldehyd in Prozenten der theoretischen Menge
1	160	0,35 g 0,213 %	35	500	0,006	**0,0012**	0,2016	**0,0395**	0,0023	0,0758	**0,0735**	20,0
2	160	0,276 g 0,172 %	35	500	0,016	**0,0031**	0,2750	**0,0539**	0,0059	0,1035	**0,0976**	33,8
3	100	0,5 g 0,5 %	30	400	0,0566	**0,0110**	0,2762	**0,0541**	0,0165	0,0811	**0,0646**	12,3
4	200	1,13 g 0,56 %	30	500	0,0277	**0,0054**	0,2086	**0,0408**	0,0129	0,0979	**0,0850**	7,2
5	200	1,0 g 0,5 %	30	450	0,0568	**0,0111**	0,1800	**0,0352**	0,0296	0,0938	**0,0642**	6,1
6	100	0,22 g 0,22 %	30	350	unwägbar	—	0,1281	**0,0251**	—	0,0430	**0,0430**	18,7
7	100	0,43 g 0,43 %	35	350	unwägbar	—	0,1590	**0,0312**	—	0,0535	**0,0535**	11,9
8	90	0,36 g 0,40 %	40	350	0,0324	**0,0063**	0,2386	**0,0468**	0,0097	0,0722	**0,0625**	16,6

in dem nach kurzem Stehen bei 40° verarbeiteten Versuch B weitaus größer als die in dem Versuch A gewonnenen. Wir müssen es unentschieden lassen, ob die geringen Alkoholmengen, die wir in dem Filtrat von Leber A nachweisen konnten, wirklich im normalen intermediären Zellstoffwechsel des getöteten Tieres gebildet waren, oder ob sie irgendwie mit der Äthernarkose in Zusammenhang standen, oder ihr Auftreten durch Resorption von bakteriell gebildetem Alkohol aus dem Darmkanal bedingt war.

Ausschließen dürfen wir jedenfalls auf Grund der Angaben von Masuda, daß etwa die in einem Teil der Versuche A nicht ganz unerheblichen Alkoholmengen nur durch der Zerstörung mit Silberoxyd entgangenen Acetaldehyd vorgetäuscht waren[1]).

In allen Fällen war, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, eine sehr erhebliche Bildung von Alkohol eingetreten. Die in

[1]) Hier sei übrigens ausdrücklich hervorgehoben, daß Lösungen von reinem Acetaldehyd bei dem Zeisel-Fanto-Verfahren höchstens spurweise Jodsilber liefern.

B vorhandene Alkoholmenge beträgt in dem ungünstigsten Versuche (Tabelle I, Versuch 5) mehr als das Dreifache von der in A vorhandenen; in den meisten Versuchen gehört der aus Versuch B bestimmte Alkohol einer ganz anderen Größenordnung wie der Alkohol aus Versuch A an.

In den Kolonnen 10 und 11 sind die Alkoholmengen A und B auf die gesamte für jeden einzelnen Versuch verwandte Lebermenge umgerechnet, aus der Differenz dieser beiden Kolonnen ergibt sich die aus Kolonne 12 ersichtliche Gesamtzunahme des Alkohols während des Versuches.

In Kolonne 13 ist auf Grund der in den Kolonnen 3 und 12 erhaltenen Angaben die Alkoholbildung aus dem Aldehyd in Prozenten der theoretisch möglichen Menge angegeben. Prozentisch ist am meisten Aldehyd in Alkohol umgewandelt in Versuch 2 (33,8 %), wo der Aldehydzusatz in Prozenten des angewandten Leberbreigemisches am geringsten war, während die Umwandlung des Aldehyds in Alkohol prozentisch am geringsten war in den Versuchen 4 und 5, in denen neben Versuch 3 der stärkste Aldehydzusatz erfolgte.

Ehe wir endgültig behaupten dürfen, daß der in den Versuchen 1 bis 8 gebildete Alkohol wirklich durch Reduktion des zugesetzten Acetaldehyds entstanden war, müssen wir zeigen daß die Leber ohne Acetaldehydzusatz unter den gleichen Bedingungen keinen Alkohol bildet. Dies geht nun ohne weiteres aus Tabelle II, Versuche 9 und 10, hervor.

Ein Blick auf die Kolonnen 7 und 9 lehrt, daß beim Stehen von Leberbrei ohne Aldehydzusatz nicht nur keine Vermehrung, sondern im Gegenteil eine Verminderung des von vornherein vorhandenen Alkohols stattfindet. Es sei noch erwähnt, daß die Versuche 9 und 10 absichtlich an der ziemlich stark glykogenhaltigen Leber vorgenommen wurden, um das reichliche Vorhandensein der möglichen Muttersubstanzen des Alkohols zu gewährleisten.

Unter Berücksichtigung der in Tabelle II niedergelegten Ergebnisse erscheinen diejenigen in Tabelle I unbedingt beweisend dafür, daß der hier gebildete Alkohol wirklich entstanden war durch Reduktion des zugesetzten Acetaldehyds.

In einer Reihe weiterer Versuche haben wir die Leber unter Zusatz von Acetaldehyd künstlich mit Rinderblut durch-

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nr. des Versuchs	Für jeden Einzelversuch verwandte Menge Leberbrei g	Jedem Einzelversuch zugesetzte Aldehydmenge in Gramm u. Prozenten der Leberbreimenge	Versuch B wurde verarbeitet nach einem Aufenthalte im Wasserbade von 40° von Min.	Von jedem Einzelversuch verarbeitete Filtratmenge ccm	Auf das Gesamtdestillat aus dieser Filtratmenge berechnete Menge Jodsilber für A g	Daraus berechnete Menge Alkohol g	Auf das Gesamtdestillat aus der in Kolonne 5 genannten Filtratmenge berechnete Menge Jodsilber für B g	Daraus berechnete Menge Alkohol g	Alkoholmenge in der Gesamtflüssigkeit A g	Alkoholmenge in der Gesamtflüssigkeit B g	Gesamtabnahme des Alkohols g	Menge des verschwundenen Alkohols i. Prozenten der ursprünglich vorhandenen Menge
9	100	0	60	400	0,0212	**0,0041**	0,0159	**0,0031**	0,0062	0,0047	0,0015	24,4
10	280	0	60	500	0,024	**0,0047**	0,0150	**0,0029**	0,0158	0,0097	0,0061	38,6

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nr. des Versuchs	Menge des Durchblutungsblutes ccm	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Aldehydmenge g	Dauer der Durchblutung Min.	Von Blut A und B verarbeitete Filtratmenge ccm	Auf das Gesamtdestillat aus dem Filtrat A berechnete Menge Jodsilber g	Daraus berechnete Menge Alkohol g	Auf d. Gesamtdestillat aus d. Filtrat B berechnete Menge Jodsilber g	Daraus berechnete Menge Alkohol g	Alkoholmenge in 1000 ccm Blut A	Alkoholmenge in 1000 ccm Blut B	Alkoholbildung während d. Durchblutung pro Liter des Durchblutungsblutes
11	1600	1,6	40	2000 A 2000 B	0,007	**0,0014**	0,2766	**0,0542**	0,0042	0,1626	0,1584
12	1600	2,1	40	500 A 1500 B	unwägbare Spuren	nicht bestimmbar	0,2998	**0,0588**	nicht bestimmbar	0,2352	0,2352
13	1600	2,0	40	500 A 1500 B	0,099 auf 1500 ccm Filtrat umgerechnet	**0,0195**	0,3745	**0,0734**	0,0780	0,2936	0,2156

strömt, um zu sehen, ob auch unter diesen, den Verhältnissen im lebenden Organismus sehr viel näher kommenden Versuchsbedingungen Reduktion von Acetaldehyd zu Alkohol eintritt. Dieses ist nun in der Tat der Fall.

In Versuch 11 (Tabelle III) fanden sich in dem Destillat aus 2000 ccm Blutfiltrat vor der Durchblutung[1]) nur ganz ge-

[1]) Es sei ausdrücklich hervorgehoben, daß, ähnlich wie in den Organbreiversuchen, auch in den Durchblutungsversuchen dem sofort verarbeiteten Blut die prozentisch gleiche Menge Acetaldehyd zugesetzt wurde, wie dem zur Durchblutung bestimmten.

ringe Mengen Alkohol (etwa $1^1/_2$ mg) (Versuch 11, Kolonne 7), während in dem Destillat aus der gleichen Filtratmenge des zur Durchströmung benutzten Blutes 54 mg vorhanden waren. In Versuch 13 enthielten 500 ccm Blutfiltrat A (vor der Durchblutung) nur unbestimmbare Spuren Alkohol, 1500 ccm Blutfiltrat B (Filtrat aus dem Durchblutungsblute) annähernd 59 mg. In Versuch 13 war von vornherein im angewandten Blute relativ viel Alkohol vorhanden, auf die für die Alkoholbestimmung in B angewandte Filtratmenge (1500 ccm) umgerechnet mehr als 19 mg. Aber auch hier ist die Alkoholbildung während der Durchblutung eine sehr beträchtliche. Aus 1500 ccm Blutfiltrat B wurden über 73 mg Alkohol bestimmt.

Die Frage, ob der Alkohol in den Durchblutungs- und auch in den Organbreiversuchen in freier Form vorhanden war, oder ob er erst während der Destillation des Filtrats aus irgendeiner gepaarten Verbindung abgespalten wurde, haben wir einstweilen nicht untersucht. Sie ist auch für das wesentlichste Ergebnis der vorliegenden Arbeit, daß nämlich nicht nur unter den gleichsam anaeroben Bedingungen des Organbreiversuchs, sondern auch bei der Durchblutung der Leber mit sauerstoffreichem Blute Acetaldehyd zu Alkohol reduziert wird, gleichgültig

Darüber, ob die Umwandlung des Acetaldehyds zu Äthylalkohol ausschließlich nach dem Typus der Cannizaroschen Umlagerung (Parnas, l. c.) erfolgt, geben unsere Versuche keine Auskunft.

Auf andere Organe als die Leber haben wir bisher die Versuche mit Acetaldehyd nur in geringem Umfange ausgedehnt. In einigen Versuchen mit Nierenbrei war die Reduktion des Aldehyds zum Alkohol gegenüber den Leberversuchen nur recht gering. Dies stimmt insofern mit den Ergebnissen von Parnas überein, als auch in seinen Versuchen die Umwandlung von Aldehyden in die entsprechenden Alkohole (und die entsprechenden Säuren) gerade unter der Einwirkung von Leberbrei, Leberpreßsaft usw. in besonders hohem Maße erfolgte.

Über Acetessigsäurebildung aus einigen Dicarbonsäuren mit 4 C-Atomen.

Von

Koshi Ohta.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß eine Reihe verschiedenartiger Fettsäuren und aliphatischer und aromatischer Aminosäuren bei der künstlichen Durchströmung der Leber unter intermediärer Bildung von Acetessigsäure abgebaut werden, wodurch wichtige Aufschlüsse über das Verhalten von Fettsäuren und Aminosäuren im Tierkörper gewonnen werden konnten.

Neuerlich konnte dann durch J. Wirth festgestellt werden, daß neben Spaltprodukten von Fetten und Eiweißkörpern auch verschiedene chemisch dem Zucker sehr nahestehende Substanzen bei der Durchströmung der Leber sich als Acetessigsäurebildner erweisen[1]).

In erster Linie ist hier die d-Zuckersäure zu nennen, die, in größerer Menge dem Durchblutungsblute zugefügt, die Acetessigsäurebildung in der Leber regelmäßig sehr beträchtlich steigert, während die Einwirkung der Gluconsäure auf die Acetessigsäurebildung weniger sicher war und auch die Versuche mit Schleimsäure, offenbar durch die vasokonstriktorische Wirkung dieser Substanz auf die Lebergefäße, in ungünstiger Weise beeinflußt wurden.

Über den Chemismus der Acetessigsäurebildung aus Zuckersäure geben die Versuche von Wirth keinen Aufschluß. Es

---

[1]) J. Wirth, Abbau von Kohlenhydratsäuren in der Leber. Diese Zeitschr. 33, 49, 1911.

lag auf Grund dieser Versuche sehr nahe, die Frage zu prüfen, ob auch der Zuckersäure homologe Substanzen von der Leber in Acetessigsäure umgewandelt werden können.

Ich habe auf Veranlassung von Professor Embden derartige Versuche unternommen. Dieselben beschränkten sich zunächst auf einige wenige Substanzen.

Von besonderer Wichtigkeit erschien die Untersuchung einer der Zuckersäure homologen Säure, die in der Natur in weiter Verbreitung vorkommt und möglicherweise mit der Zuckersäure in enger genetischer Beziehung steht, nämlich der d-Weinsäure und der ihr stereoisomeren Substanzen.

Es wurden daher sechs Versuche mit d-Weinsäure vorgenommen, deren notwendige Einzelheiten und Ergebnisse aus Tabelle I, Versuche 1 bis 6, ersichtlich sind[1]).

In den Versuchen 1 bis 4 kamen je 6 g mit Ammoniak neutralisierter Weinsäure zur Anwendung. In allen 4 Versuchen ist die Bildung von Acetessigsäure, die zwecks unmittelbarer Vergleichbarkeit mit früheren Versuchen auch hier als „Aceton" berechnet ist, ganz erheblich gesteigert. Die „Acetonbildung" schwankt zwischen 46 mg in dem mangelhaft verlaufenden Versuch 3 und 93 mg in Versuch 1, während bei Leerversuchen die entsprechenden Werte 12 bis 27 mg betragen. Auch bei Zusatz von 2 g Weinsäure (Versuch 5) ist die Acetonbilduug pro Liter noch 75 mg. Dagegen konnte in einem Versuche mit 1 g Weinsäure (Versuch 6) eine vermehrte Acetonbildung nicht festgestellt werden. Fraglos ist also die Weinsäure als ein sehr kräftiger Acetessigsäurebildner anzusehen.

Ähnlich wie von der Zuckersäure sind auch von der Weinsäure offenbar etwas größere Mengen als von manchen anderen Substanzen nötig, um eine deutliche Acetessigsäurebildung zu erzielen.

In ähnlichem Umfange wie die d-Weinsäure erweist sich auch die Traubensäure, von der in Versuch 7 6 g dem Durchblutungsblute zugesetzt wurden, als Acetessigsäurebildner (Acetonbildung pro Liter 76 mg).

---

[1]) Die Technik meiner Versuche war ganz die im hiesigen Institut übliche. Wie immer hatten die Hunde vor dem Versuche 24 Stunden gehungert. Ich bediente mich des neuerlich im hiesigen Institut stets angewandten modifizierten Mandelschen Durchblutungsapparates.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Menge Rinderblut ccm	Dauer der Durchblutung Minuten	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter des Durchblutungsblutes mg	Bemerkungen
1	180	1600	60	6,0 g d-Weinsäure mit Ammoniak neutralisiert	93	
2	180	1600	60	6,0 g d-Weinsäure mit Ammoniak-neutralisiert	90	
3	140	1600	60	6,0 g d-Weinsäure mit Ammoniak neutralisiert	46	Verlauf der Durchblutg. bei hohem Druck mangelhaft
4	310	1600	60	6,0 g d-Weinsäure mit Ammoniak-neutralisiert	79	
5	270	1600	60	2,0 g d-Weinsäure mit Ammoniak neutralisiert	75	
6	195	1600	60	1,0 g d-Weinsäure mit Ammoniak neutralisiert	27	Verlauf der Durchblutg. sehr gut
7	250	1600	60	6,0 g Traubensäure mit Ammoniak neutralisiert	76	

Ich bin nunmehr dazu übergegangen, 2 weitere Dicarbonsäuren mit 4 Kohlenstoffatomen zu untersuchen, eine, die eine ungesättigte Bindung enthält, die Maleinsäure, und ferner den einfachsten Repräsentanten dieser Gruppe, die Bernsteinsäure. Aus den in Tabelle II, Versuche 8 bis 10, niedergelegten Versuchen mit je 6 g Maleinsäure geht hervor, daß auch diese Substanz die Acetessigsäurebildung in der künstlich durchströmten Leber sehr deutlich zu steigern vermag.

In Versuch 8 beträgt die Acetonbildung pro Liter zwar nur 44 mg, doch war hier, ähnlich wie in Versuch 3 der Ta-

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Menge Rinderblut ccm	Dauer der Durchblutung Minuten	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter des Durchblutungsblutes mg	Bemerkungen
8	148	1600	60	6,0 g Maleinsäure mit Ammoniak neutralisiert	44	Verlauf der Durchblutg. bei hohem Druck mangelhaft
9	240	1600	60	6,0 g Maleinsäure mit Ammoniak neutralisiert	113	
10	117	1600	60	6,0 g Maleinsäure mit Ammoniak neutralisiert	50	

belle I, auch bei hohem Druck nur eine geringe Strömungsgeschwindigkeit zu erzielen. In Versuch 9 ist die Acetonbildung pro Liter gleich 113, in Versuch 10 gleich 50 mg.

Nicht so eindeutig wie die Versuche mit d-Weinsäure, Traubensäure und Maleinsäure fielen drei weitere Versuche mit je 6 g Bernsteinsäure aus.

In Versuch 11, Tabelle III, beträgt die Acetonbildung pro Liter 61 mg, was eine ganz beträchtliche Steigerung gegenüber Leerversuchen bedeutet, während in den Versuchen 12 und 13 die Acetonbildung pro Liter (27 mg in Versuch 12 und 15 mg in Versuch 13) nicht größer ist als in der Norm. Als sicherer Acetessigsäurebildner darf also die Bernsteinsäure nicht betrachtet werden.

Wie ist die Tatsache, daß d-Weinsäure, Traubensäure und Maleinsäure Acetessigsäure bilden, zu erklären?

Von vornherein muß hier an zwei Möglichkeiten gedacht werden. Einmal wäre es denkbar, daß das Kohlenstoffskelett bei der Umwandlung der genannten Substanzen in Acetessigsäure erhalten bleibt. In diesem Falle ist die Annahme notwendig, daß eine Carboxylgruppe bis zur Methylgruppe reduziert wird. Eine zweite Möglichkeit wäre die, daß die acetessigsäure-

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuchs	Gewicht der Leber g	Menge Rinderblut ccm	Dauer der Durchblutung Minuten	Dem Durchblutungsblute zugesetzte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter des Durchblutungsblutes mg	Bemerkungen
11	180	1600	60	6,0 g Bernsteinsäure mit Ammoniak neutralisiert	61	
12	120	1600	60	6,0 g Bernsteinsäure mit Ammoniak neutralisiert	27	
13	370	1600	60	6,0 g Bernsteinsäure mit Ammoniak neutralisiert	15	

bildenden Dicarbonsäuren zunächst bis zu einem gewissen Grade abgebaut werden und daß intermediär entstandene Abbauprodukte wieder zum Aufbau von Acetessigsäure Verwendung finden.

Hier sei daran erinnert, daß nach den Versuchen von Friedmann Acetaldehyd offenbar unter intermediärer Aldolbildung bei der Durchblutung der Leber in Acetessigsäure umgewandelt werden kann. Namentlich möchte ich aber auf neuerlich angestellte Versuche von C. Neuberg[1]) hinweisen, der zeigen konnte, daß unter der katalysierenden Einwirkung von Uransalz Weinsäure durch das Sonnenlicht in Glyoxal umgewandelt werden kann.

$$\mathrm{COOHCHOHCHOHCOOH} \longrightarrow \begin{matrix} \mathrm{O} & & \mathrm{O} \\ & \mathrm{C}-\mathrm{C} & \\ \mathrm{H} & & \mathrm{H} \end{matrix}$$

Vor allem aber sei hier auf Versuche hingewiesen, die Neuberg und Saneyoshi[2]), sowie Neuberg und Karczag[3])

[1]) C. Neuberg, Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten. I. Diese Zeitschr. 13, 317, 1908.

[2]) C. Neuberg und S. Saneyoshi, diese Zeitschr. 36, 56, 1911.

[3]) C. Neuberg und L. Karczag, daselbst. 36, 60, 1911.

anstellten. Die genannten Autoren fanden, daß unter dem Einfluß von Hefe d-Weinsäure unter Kohlensäureabspaltung zum Verschwinden gebracht wird. Für die Oxymaleinsäure (Oxalessigsäure), die den von mir untersuchten Substanzen sehr nahe steht, konnten Neuberg und Karczag die Zerlegung in Kohlensäure und Acetaldehyd dartun. Diese Zerlegung erfolgt nach den genannten Autoren durch ein lösliches, von ihnen Karboxylase genanntes Ferment.

Im Zusammenhang damit mag auch darauf hingewiesen werden, daß nach Brasch und Neuberg[1]) unter dem Einfluß von Fäulnisbakterien aus Glutaminsäure Buttersäure gebildet wird

$$COOHCHNH_2CH_2CH_2COOH \longrightarrow CH_3CH_2CH_2COOH,$$

aus einer Aminodicarbonsäure, also die um einen Kohlenstoff ärmere Monocarbonsäure. Hiernach wäre es vielleicht nicht völlig ausgeschlossen, daß bei der Umwandlung der in meinen Versuchen in Betracht kommenden Dicarbonsäuren durch eine Kombination der beiden letztgenannten Reaktionen Acetaldehyd als intermediäres Produkt auftritt. Vielleicht werden weitere Versuche, die im hiesigen Institut unternommen werden sollen, darüber Aufschluß geben. Ich möchte hier nur darauf hinweisen, daß in den von mir gewonnenen Destillaten offenbar neben Aceton noch Substanzen aldehydartiger Natur sich fanden.

Bei Anwendung des in einer voranstehenden Arbeit von Masuda geschilderten Verfahrens konnte ich nämlich in mehreren Fällen zeigen, daß ein Teil der jodbindenden flüchtigen Substanz im Gegensatz zum Aceton bei kurzdauerndem Kochen mit frisch gefälltem Silberoxyd unter Rückfluß in der von Masuda geschilderten Weise zerstört war.

Diese mit Silberoxyd zerstörbare Substanz ließ sich auch noch in Destillaten nachweisen, die durch Redestillation der zunächst bei saurer Reaktion gewonnenen Destillate nach Alkalisieren mit etwas Natronlauge erhalten waren.

Hieraus folgt jedenfalls, daß die mit Wasserdampf flüchtige jodbindende und mit Silberoxyd zerstörbare Substanz keine Säure war.

---

[1]) W. Brasch und C. Neuberg, Biochemische Umwandlung der Glutaminsäure in n-Buttersäure. Daselbst S. 299.

Wie aber auch der nähere Chemismus der Umwandlung von Weinsäure in Acetonkörper sein mag (mit der Möglichkeit der Acetessigsäurebildung aus Weinsäure ist ja ohne weiteres die der β-Oxybuttersäurebildung und vielleicht auch der Buttersäurebildung gegeben), jedenfalls dürfte die Umwandlung von Weinsäure in Acetessigsäure von allgemeinerem biologischem Interesse sein, insbesondere im Zusammenhalt mit den obenerwähnten Versuchen von J. Wirth.

Es liegt zum mindesten die Annahme sehr nahe, daß bei der Umwandlung der Zuckersäure in Acetessigsäure als intermediäres Produkt Weinsäure oder eine der Weinsäure nahestehende Sustanz auftritt[1]).

Somit sind vielleicht für die Erkenntnis der biologischen Stellung der Weinsäure und der Wege, auf denen die Umwandlung von kohlenhydratartigen Substanzen in fettähnliche erfolgt, in den vorliegenden, noch keineswegs abgeschlossenen Untersuchungen wichtige Hinweise enthalten.

---

[1]) C. Neuberg hat in seiner bereits erwähnten Arbeit, l. c. S. 308, Anhaltspunkte für die Bildung von Weinsäuredialdehyd aus d-Zuckersäure unter dem Einfluß des Sonnenlichts gewonnen.

Über den Chemismus der Glycerinbildung im Tierkörper.

Von

G. Embden, E. Schmitz und K. Baldes.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In einer voranstehenden Arbeit gelangten wir zu dem Ergebnis, daß der Abbau des Traubenzuckers im tierischen Organismus unter intermediärer Bildung von optisch aktivem Glycerinaldehyd erfolgt, der direkt in d-Milchsäure umgelagert wird.

Es lag nunmehr sehr nahe, zu untersuchen, ob Glycerinaldehyd, der offenbar das hauptsächlich in Betracht kommende erste Abbauprodukt des Traubenzuckers im Tierkörper darstellt, als Muttersubstanz eines in der organischen Welt weitverbreiteten Körpers, nämlich des Glycerins, anzusehen ist.

Die Herkunft des Glycerins aus Kohlenhydraten und insbesondere aus den beim Abbau der letzteren entstehenden Triosen ist bereits öfters vermutet worden, so z. B. von Buchner und Meisenheimer[1]), die beweisen konnten, daß das bei der Hefegärung auftretende Glycerin ein Abbauprodukt des Traubenzuckers ist, und auf die Möglichkeit seiner Entstehung durch Reduktion von Dioxyaceton hinwiesen.

Ein besonderer Hinweis auf die Möglichkeit der Glycerinbildung aus Triosen liegt in den Untersuchungen von J. Parnas[2]), aus denen hervorgeht, daß die Bildung von Alkoholen aus den entsprechenden Aldehyden nach dem Typus der Cannizzaro-

---

[1]) Buchner und Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 1882, 1910.

[2]) J. Parnas, diese Zeitschr. **28**, 274, 1910.

schen Umlagerung durch ein in tierischen Geweben nachweisbares Ferment — die Aldehydmutase — beschleunigt wird.

In jüngster Zeit — bereits nach dem Abschlusse der im folgenden mitzuteilenden Versuche — haben Parnas und Baer[1]), sowie auch J. Smedley[2]) die Möglichkeit der reduktiven Bildung von Glycerin aus Triosen ausgesprochen.

Eine direkte experimentelle Prüfung dieser Frage liegt aber — soweit wir unterrichtet sind — bisher weder für die Glycerinbildung bei der Hefegärung noch für diejenige im tierischen Organismus vor.

In einer voranstehenden Arbeit von E. Schmitz[3]) wurde untersucht, ob bei der künstlichen Durchblutung der Leber Glycerin auftritt und ob der Glyceringehalt des Blutes am Ende der Durchblutung vom Glykogengehalt der Leber abhängig ist. Die Ergebnisse dieser Versuche waren nicht eindeutig, wenn es auch schien, als ob ähnlich dem Verhalten der Milchsäure bei der Durchströmung der glykogenarmen Leber eher eine Abnahme, bei der Durchblutung der stark glykogenhaltigen eine geringfügige Vermehrung des Glycerins einträte.

Die Glycerinbildung in der glykogenhaltigen Leber erschien vielleicht deshalb so gering, weil die künstlich durchströmte Leber, was ebenfalls von Schmitz gezeigt wurde, sehr erhebliche Mengen von Glycerin zum Verschwinden bringen kann, wie aus einer voranstehenden Arbeit von S. Oppenheimer[4]) hervorgeht, unter Bildung von Milchsäure.

Von den beiden Triosen Glycerinaldehyd und Dioxyaceton kommt nach dem Ergebnis unserer eingangs erwähnten Untersuchungen der Glycerinaldehyd zum mindesten weit mehr als das Dioxyaceton als intermediäres Produkt bei der im tierischen Organismus erfolgenden Umwandlung von Traubenzucker in d-Milchsäure in Betracht.

Wir haben daher unser Augenmerk zunächst auf die Frage gerichtet, ob Glycerinaldehyd durch tierisches Gewebe in Glycerin umgewandelt werden kann; über entsprechende Versuche mit Dioxyaceton soll später berichtet werden.

---

[1]) J. Parnas und J. Baer, diese Zeitschr. 41, 386, 1912.
[2]) Smedley, Journ. of Physiol. 45, 203, 1912.
[3]) E. Schmitz, diese Zeitschr. 45, 18, 1912.
[4]) S. Oppenheimer, diese Zeitschr. 45, 30, 1912.

Methodisches.

Die Versuche wurden zum Teil am lebensfrischen Organbrei, zum Teil an der künstlich durchbluteten Leber von Hunden vorgenommen.

Die Organbreiversuche wurden in folgender Weise angestellt:

Möglichst rasch nach dem in Äthernarkose durch Entbluten erfolgten Tode des Tieres wurde das zu untersuchende Organ mit der Fleischhackmaschine zerkleinert und gleiche, gewogene Mengen Organbrei weiter verarbeitet.

Die Portionen A wurden sofort nach Schenck gefällt, die Portionen B nach Zusatz des ihrem Gewicht entsprechenden Volumens Kochsalzlösung von 0,85 % in hermetisch verschlossenen Glasgefäßen während 30 bis 35 Minuten im Wasserbade von 40° gehalten und dann genau wie die Portionen A behandelt.

Die Portionen B_1 erhielten keinen weiteren Zusatz, den Portionen B_2 wurde eine gewogene Menge reinen krystallisierten d-l-Glycerinaldehyds, der in der zur Verdünnung des Organbreies dienenden Kochsalzlösung gelöst war, zugesetzt.

Den gleichen Zusatz erhielten von den sofort verarbeiteten A-Bestimmungen die mit A_2 bezeichneten, während die Portionen A_1 ohne Glycerinaldehydzusatz gefällt wurden. Erwähnt sei noch, daß der Glycerinaldehyd zu A_2 erst hinzugesetzt wurde, nachdem die bei der Fällung nach Schenck angewandte Salz säure einen Augenblick auf den Organbrei gewirkt hatte, um die Einwirkung lebensfrischen Gewebes auf den Glycerinaldehyd auszuschalten.

Die weitere chemische Verarbeitung nach der Schenckschen Fällung schloß sich, soweit die Anwesenheit von Glycerinaldehyd nicht Abweichungen erheischte, eng an die in der obenerwähnten Arbeit von Schmitz geschilderte Methodik an. Nur fügten wir der zweiten Ätheralkoholfällung (1 Teil Alkohol und 1 Teil Äther) noch eine dritte (1 Teil Alkohol und 2 Teile Äther) hinzu. Glycerin gerät hierdurch bei den in Betracht kommenden Konzentrationen nicht in Verlust, hingegen wird bei der dritten Ätheralkoholfällung häufig noch reduzierende Substanz beseitigt.

Ferner nahmen wir die sämtlichen Einengungen im Vakuum bei möglichst niedriger Temperatur vor, während sich Schmitz

für die erste Einengung der entquecksilberten Extrakte des Verdunstkastens nach Faust bediente.

Besondere Modifikationen der Methode waren durch die Anwesenheit von Glycerinaldehyd bedingt. Zwar liefert reiner Glycerinaldehyd, dem Zeisel-Fantoschen Verfahren unterworfen, nur äußerst geringe Mengen Jodsilber, aber bei kleinen Ausschlägen in den Bestimmungen mußten auch diese in Betracht kommen.

Die Beseitigung des Glycerinaldehyds durch Oxydation geschah entweder mit frisch gefälltem Silberoxyd oder mit Quecksilberoxyd und Alkali in der Kälte. Weder bei der Silber-, noch bei der Quecksilbermethode werden Substanzen gebildet, die bei der Anwendung des Zeisel-Fantoschen Verfahrens störend wirken.

Die Oxydation mit Silberoxyd geschah, nachdem das entquecksilberte und im Vakuum bei schwach saurer Reaktion bis zur beginnenden Salzausscheidung eingeengte Organextrakt durch Alkohol von der Hauptmasse des Kochsalzes befreit worden war. Die alkoholische Lösung wurde zusammen mit dem zum Waschen des Niederschlages verwandten Alkohol unter Wasserzusatz im Vakuum eingeengt, nach Verjagung des Alkohols mit Wasser auf etwa 200 ccm aufgefüllt und direkt im Vakuumkolben mit einer ausreichenden Menge frisch gewonnenen feuchten Silberoxyds versetzt; hierbei tritt — durch Ausfällung der Salzsäure als Chlorsilber — stark alkalische Reaktion ein. (In unseren Fällen genügte meist die aus 10 g Silbernitrat gewonnene Menge Silberoxyd.)

Die Reduktion des Silberoxyds erfolgt sehr rasch, doch ließen wir die Flüssigkeit unter häufigem Schütteln, ev. unter Zusatz von neuem Silberoxyd, meist 60 Minuten oder länger stehen. Dann wird das in Lösung gegangene Silber durch Versetzen mit Salzsäure bis zur deutlich mineralsauren Reaktion ausgefällt. Der Chlorsilberniederschlag reißt auch das zum Teil in kolloidaler Form vorhandene Silber mit. Die Flüssigkeit wird vom Niederschlag abfiltriert, der Niederschlag bis zum Verschwinden der sauren Reaktion des Waschwassers mit kaltem Wasser gewaschen, Filtrat und Waschwasser bei ganz schwach saurer Reaktion eingeengt, wieder mit Alkohol gefällt und, ganz wie es von Schmitz geschildert wurde, bis zur zweiten

Ätheralkoholfällung (1 Teil Äther, 1 Teil Alkohol) weiterbehandelt.

Nach Verjagung des Äthers und der Hauptmasse des Alkohols wurden nun nochmals 100 ccm absoluten Alkohols hinzugesetzt und dann unter Schütteln mit 200 ccm Äther gefällt (s. oben). Nach der Entfernung des entstehenden Niederschlags durch Filtration und gründlichem Auswaschen mit einem Gemenge von 2 Teilen Äther und 1 Teil Alkohol wurde die Flüssigkeit unter Zusatz von etwa 20 ccm Wasser im Vakuum bis auf etwa 15 ccm eingeengt, in ein Porzellanschälchen übergespült, auf etwa 80 bis 100 ccm aufgefüllt und auf dem Wasserbade zur Verjagung der letzten Alkoholspuren bis auf wenige Kubikzentimeter eingeengt. Nun wurde auf ein bestimmtes kleines Volumen (7 bis 10 ccm) aufgefüllt, die so gewonnene Endflüssigkeit durch ein trockenes Filter filtriert und 5 ccm davon dem Zeisel-Fantoschen Verfahren unterworfen.

Bei Anwendung von Silberoxyd als Oxydationsmittel ist es nötig, die ursprünglich quecksilberhaltige Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff zu entquecksilbern.

Wir haben bei einer früheren Gelegenheit bereits darauf hingewiesen, daß Schwefelwasserstoff offenbar sehr leicht eine Additionsverbindung mit Glycerinaldehyd bildet und konnten gerade deswegen die Befürchtung nicht ganz unterdrücken, daß durch das Einleiten von Schwefelwasserstoff Glycerinaldehyd zu Glycerin reduziert werden könnte. Allerdings geht aus unseren Kontrollversuchen hervor, daß bei Anwesenheit von Glycerinaldehyd (allen A_2-Bestimmungen wurde ja Glycerinaldehyd hinzugefügt) die durch Schwefelwasserstoff entquecksilberten Flüssigkeiten A kaum größere Mengen Jodsilber lieferten als bei Abwesenheit. Dennoch suchten wir auch diesen geringen Fehler der Methode zu beseitigen, indem wir den Glycerinaldehyd noch in dem nach Schenck gewonnenen quecksilberhaltigen Filtrat durch Oxydation zu zerstören suchten (s. Embden, Baldes und Schmitz, diese Zeitschr. 45, 116, 1912).

Wir versetzten zu dem Zwecke gleiche, gemessene Mengen des Schenckschen Filtrats mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion; das ausfallende Quecksilberoxyd wird in den sofort unter Glycerinaldehydzusatz verarbeiteten Bestimmungen A_2 sehr rasch schwarzgrau, in den Bestimmungen B_2,

in denen offenbar der größte Teil des Glycerinaldehyds umgewandelt ist, tritt die Verfärbung sehr viel langsamer und schwächer ein. Durch öfters wiederholten Zusatz von gemessenen Mengen Quecksilberchloridlösung und starker Natronlauge, sowie durch häufiges Schütteln wird die Reaktion allmählich vervollständigt. Nach etwa 2 Stunden zeigt eine entnommene Probe, die durch Zentrifugieren geklärt wird, beim nochmaligen Zusatz von Quecksilberchlorid und Natronlauge auch nach längerem Stehen in der Kälte keine Reduktion des Quecksilbers.

Nunmehr wird die Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert, ohne Rücksicht auf den ungelöst bleibenden, zum Teil offenbar aus Mercurochlorid bestehenden Niederschlag Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis der Niederschlag die gleichmäßig schwarze Beschaffenheit des Quecksilbersulfids angenommen hat, alsdann der überschüssige Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom entfernt, filtriert und mit kaltem Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion nachgewaschen. Die weitere Verarbeitung der so gewonnenen Flüssigkeiten geschieht in der von Schmitz beschriebenen Weise, nur daß, wie schon oben erwähnt, bereits die erste Einengung bei schwach saurer Reaktion im Vakuum vorgenommen wird und sich an die zweite Ätheralkoholfällung noch eine dritte anschließt.

Wir müssen noch erwähnen, daß auch bei Anwendung der eben beschriebenen Methode der durch die Anwesenheit von Glycerinaldehyd bedingte Fehler der Glycerinbestimmung nicht beseitigt wird; doch ist er so gering, daß ihm bei der Beurteilung unserer Versuche keine praktische Bedeutung zukommt. Es erscheint danach ziemlich gleichgültig, ob man zur Beseitigung des Glycerinaldehyds das Silber- oder das Quecksilberverfahren anwendet. Wir benutzten beide Methoden nebeneinander, bei demselben Versuche jedoch in allen Einzelbestimmungen die gleiche.

Versuchsergebnisse.

Unsere am Organbrei gewonnenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle I (Versuch 1 bis 5) zusammengestellt. Aus dieser Tabelle sind auch alle notwendigen Einzelheiten der Versuchsanordnung sowie die analytischen Daten ersichtlich.

In den Versuchen 1 und 2 kam Leberbrei zur Anwen-

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Nr. des Versuchs	Für jeden Einzelversuch verwendeter Organbrei	Menge d. den Portionen A_2 u. B_2 zugesetzten Glycerinaldehyds g	Dauer des Aufenthalts der Portionen B bei 40° Min.	Gesamtflüssigkeitsmenge nach der Fällung ccm	Vom Filtrat weiter verarbeitet ccm	Volumen der Endflüssigkeit ccm	Davon zur Glycerinbestimmung verwendet ccm	Gewogene Menge AgJ in				Im Ganzen gebildete Glycerinmenge aus Glycerinaldehyd g	Glycerin aus Glycerinaldehyd in Prozenten der theoretisch möglichen Menge	Glycerinmenge in 100 g Organbrei				Bemerkungen
								A_1 g	A_2 g	B_1 g	B_2 g			A_1 g	A_2 g	B_1 g	B_2 g	
1	180 g Leberbrei	0,375	30	1105	750	10	5	—	0,0176	0,0770	0,1048	**0,0321**	**8,4**	—	0,0113	0,0494	0,0673	
2	150 g Leberbrei	0,40	35	900	600	7	5	0,0256	0,0275	0,0602	0,0801	**0,0164**	**4,0**	0,0141	0,0151	0,0331	0,0440	**Bei A_1 ging eine kleine Menge Filtrat verloren. Der Wert ist daher etwas z. niedrig.**
3	19 g Nierenbrei	0,40	35	124	90	7	5	—	0,0075	0,0090	0,0226	**0,0103**	**2,5**	—	0,0299	0,0358	0,0900	
4	38 g Nierenbrei	0,40	35	218	150	7	5	—	0,0105	0,0175	0,0576	**0,0320**	**7,8**	—	0,0221	0,0368	0,1210	
5	30 g Nierenbrei	0,40	35	180	140	7	5	0,0063	0,0070	0,0105	0,0330	**0,0159**	**3,9**	0,0148	0,0165	0,0247	0,0777	

dung, in Versuch 1 180 g, in Versuch 2 nur 150 g für jeden Einzelversuch. Die Menge des zugesetzten Glycerinaldehyds war in Versuch 1 = 0,375 g, in allen übrigen Versuchen = 0,4 g.

Betrachten wir zunächst in Versuch 1 die Kolonnen 10, 11 und 12, die unmittelbar miteinander vergleichbar sind, so sehen wir, daß die gewogene Menge Silberjodid, die der vorhandenen Glycerinmenge entspricht, am kleinsten ist in der Bestimmung A_2 (Kolonne 10), die sofort unter Glycerinaldehydzusatz verarbeitet wurde, sehr viel größer in Portion B_1 (nach 30 Minuten bei 40° ohne Zusatz verarbeitet, Kolonne 11) und wieder erheblich größer in B_2 (wie B_1 behandelt, jedoch mit Zusatz von Glycerinaldehyd).

Ganz ähnlich ist das Ergebnis in Versuch 2. Es findet also nach kurzdauerndem Stehen von Leberbrei ohne Zusatz eine recht erhebliche Glycerinbildung statt, höchstwahrscheinlich durch fermentative Fettspaltung. Jedenfalls aber wird die Glycerinbildung durch Zusatz von Glycerinaldehyd ganz erheblich gesteigert. In Kolonne 13 ist berechnet, wieviel Glycerin im ganzen in B_2 mehr als in B_1 gebildet wurde. Diese Glycerinmenge ist als „Glycerin aus Glycerinaldehyd“ bezeichnet.

Die Menge des Glycerins aus Glycerinaldehyd beträgt im ersten Versuch 0,0321 g oder 8,4 % der dem zugesetzten Glycerinaldehyd äquivalenten Glycerinmenge, im zweiten Versuch 0,0164 g oder 4,0 % der theoretisch möglichen Menge.

In Versuch 2 wurde neben der Bestimmung A_2 (sofort unter Glycerinzusatz verarbeitet) noch eine Bestimmung A_1 ohne Glycerinaldehydzusatz ausgeführt (Kolonne 10 und 9). Wie man sieht, ist die durch die Anwesenheit von Glycerinaldehyd bedingte Mehrbildung von Jodsilber bei der Bestimmung nach Zeisel-Fanto nur sehr gering.

Die beträchtliche in Leberbrei auch ohne Zusatz von Glycerinaldehyd erfolgende Glycerinbildung veranlaßte uns, einige Versuche am Nierenbrei anzustellen. Wie aus einem Vergleich der Kolonnen 10 und 11 in den Versuchen 3 bis 5 hervorgeht, war die Glycerinbildung bei kurzdauerndem Stehen von Nierenbrei ohne Zusatz von Glycerinaldehyd nur geringfügig. Während die Vermehrung des Glycerins in beiden Leberversuchen ohne Zusatz ein Mehrfaches des Ausgangswertes betragen hatte, kommt sie in den Nierenversuchen nur einem

Bruchteil dieses Wertes gleich. Um so deutlicher tritt hier in den Zahlen der Kolonne 12 die Mehrbildung von Glycerin unter dem Einfluß des Glycerinaldehydzusatzes hervor.

Die im ganzen aus Glycerinaldehyd gebildete Glycerinmenge beträgt in Versuch 4 0,032 g oder 7,8 % der theoretisch möglichen Menge, erreicht also fast den entsprechenden Wert des ersten Leberversuchs, trotzdem bei annähernd gleichem Glycerinaldehydzusatz die Menge des verwendeten Nierenbreis weitaus geringer, als die des Leberbreis war.

In Versuch 3, wo die geringste Menge Nierenbrei zur Anwendung gelangte, wurde nur wenig mehr als 0,01 g (2,5 % der theoretisch möglichen Menge) Glycerin aus Glycerinaldehyd gebildet, in Versuch 5 betrug der entsprechende Wert 0,0159 g oder 3,9 %. In diesem Versuch überzeugten wir uns nochmals, daß der Glycerinaldehydzusatz zur sofort verarbeiteten Organbreiportion keinen wesentlichen Fehler in der Glycerinbestimmung bedingt. (Die Bestimmung ohne Zusatz von Glycerinaldehyd weist einen um weniger als 1 mg geringeren Jodsilberwert auf, als die mit Zusatz.)

Übereinstimmend geht also aus sämtlichen bis jetzt besprochenen Versuchen hervor, daß Glycerinaldehyd bei kurzdauerndem Stehen mit Leber- oder Nierenbrei die auch ohne Zusatz erfolgende Glycerinbildung sehr beträchtlich zu steigern vermag. Ganz besonders deutlich tritt das in den Nierenversuchen hervor, weil hier die Glycerinbildung in Leerversuchen nur sehr gering ist.

Wir halten es schon auf Grund der bisherigen Versuche für unzweifelhaft, daß der zugesetzte Glycerinaldehyd selbst die Quelle für das unter dem Einfluß seines Zusatzes mehrgebildete Glycerin darstellt.

Es mußte uns nun besonders nahe liegen zu untersuchen, ob auch bei der künstlichen Durchblutung der Leber Glycerinaldehyd in merklicher Menge Glycerin bildet.

In den von Schmitz angestellten Durchblutungsversuchen war bei Verwendung glykogenarmer Lebern und Durchströmung mit Rinderblut ohne Zusatz, wie bereits oben erwähnt, eher eine Abnahme des im Blute von vornherein vorhandenen Glycerins, bei Verwendung stark glykogenhaltiger Leber vielleicht eine ganz geringe Vermehrung des Blutglycerins eingetreten.

Stärkere Zunahmen des Glycerins bei der Durchblutung unter Glycerinaldehydzusatz durften wir also ohne weiteres auf diesen Zusatz beziehen, um so mehr, als die zum Versuch benutzten Hunde vor der Durchblutung 4 bis 5 Tage gehungert hatten, ihre Lebern also jedenfalls nur geringe Mengen Glykogen enthielten.

Die Einzelheiten der Versuchsanordnung sowie die Versuchsergebnisse sind aus Tabelle II, Versuch 6 und 7 ersichtlich.

In beiden Fällen wurden unmittelbar nach Beginn der Durchblutung dem Blute 10 g d-l-Glycerinaldehyd — in 200 ccm zuckerfreier Ringer-Lösung gelöst — hinzugefügt. In Versuch 7 erhielt das sofort verarbeitete Blut A den — prozentisch — gleichen Glycerinaldehydzusatz wie das Durchblutungsblut. In Versuch 6 dauerte die Durchströmung nur 30 Minuten, im folgenden Versuch 60 Minuten. In Versuch 6 wurden die Glycerin-

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nr. des Versuchs	Gewicht d. Leber vor der Durchblutung g	Menge des Durchblutungsbluts; dem Blute zugesetzte Substanz	Dauer der Durchblutung Min.	Menge der aus 500 ccm Blutfiltrat gewonnenen Endflüssigkeit ccm	Davon zur Glycerinbestimmung verwendet ccm	Gewogene Menge AgJ in		Daraus berechn. Menge Glycerin in		In 6000 ccm Blutfiltrat B mehr gefundene Glycerinmenge als in 6000 ccm Blutfiltrat A	Neugebildete Menge Glycerin im Gesamtblut B		Bemerkungen
						Bestimmung A in g	Bestimmung B in g	6000 ccm Blutfiltrat A in g	6000 ccm Blutfiltrat B in g		g	in Prozenten der aus dem zugesetzten Glycerinaldehyd berechneten Menge	
6	160	1600 ccm Rinderblut. 10 g Glycerinaldehyd in 200 ccm Ringerscher Lösung.	30	8	5	0,0065 0,0064	0,0359 0,0340	0,0490	0,2635	0,2145	0,3959	3,9	Bei den Doppelbestimmungen ist der Berechnung deren arithmetisches Mittel zugrunde gelegt.
7	180	1800 ccm Rinderblut. Zusatz wie in Vers. 6.	60	7	5	0,0039	0,0328 0,0366	0,0257	0,2287	0,2030	0,4111	4,0	Siehe Bemerkung 6.

bestimmungen in Blut A (vor der Durchblutung) und Blut B (nach der Durchblutung) doppelt ausgeführt in Versuch 7 nur die in Blut B, d. h. die Einzelbestimmungen wurden unmittelbar nach der Schenckschen Fällung (Versuch 7) oder doch nach der Entquecksilberung des Filtrats völlig getrennt behandelt.

In den Kolonnen 7 und 8 sind die gewogenen Mengen Jodsilber — die der Doppelbestimmungen untereinander — angegeben. Da die Bestimmungen in jedem der beiden Versuche an gleichen aliquoten Teilen des Filtrats angestellt wurden, sind diese Wägungswerte miteinander vergleichbar.

Wie man sieht, ist — unter Zugrundelegung des aus den Doppelbestimmungen berechneten arithmetischen Mittels — die gewogene Menge Jodsilber in Versuch 6 B mehr als 5 mal größer, als in Versuch A, der Glyceringehalt des Blutes ist also während der Durchströmung auf mehr als das Fünffache seines Anfangswertes gestiegen, in Versuch 7 sogar auf mehr als das Achtfache.

Die in 6000 ccm Blutfiltrat A und B vorhandenen Glycerinmengen sind aus den Kolonnen 9 und 10 ersichtlich, der Mehrgehalt von 6000 ccm Blutfiltrat B aus Kolonne 11. 6000 ccm Blutfiltrat A entsprechen einer sechsfachen Blutverdünnung, also 1000 ccm Blut, 6000 ccm Blutfiltrat B einer geringeren Blutmenge, da das Durchblutungsblut mit 200 ccm Ringerscher Lösung verdünnt wurde. Unter Berücksichtigung dieser Verdünnung und der in beiden Versuchen verschiedenen Mengen Durchblutungsblut, dagegen unter Vernachlässigung der Leber, beträgt die Gesamtmenge neugebildeten Glycerins übereinstimmend in beiden Versuchen nahezu 0,4 g. Annähernd 4% des zugesetzten Glycerinaldehyds sind also am Schluß des Versuches als Glycerin nachweisbar.

Die Durchblutungsversuche bestätigen also durchaus das am Organbrei gewonnene Ergebnis, daß Glycerinaldehyd von lebensfrischen tierischen Geweben in Glycerin umgewandelt werden kann.

Ob die Reduktion des Glycerinaldehyds zu Glycerin, wie es nach den bereits erwähnten Untersuchungen von Parnas sehr möglich erscheint, mit einer Oxydation von Glycerinaldehyd zu Glycerinsäure verknüpft ist, haben wir nicht untersucht.

Die Glycerinbildung aus Glycerinaldehyd bei der Durchblutung erfolgt unter denselben Bedingungen wie die Milch-

säurebildung. Die Bildung von Glycerin ist aber weitaus geringer als die von Milchsäure.

Wir dürfen dies wohl als den Ausdruck dafür ansehen, daß die Glycerinbildung aus Glycerinaldehyd nur eine Nebenreaktion, die Milchsäurebildung hingegen die Hauptreaktion darstellt

Bei seinem Abbau in der durchbluteten Leber nimmt das Glycerin, wie aus einer vorangehenden Arbeit von S. Oppenheimer[1]) hervorgeht, seinen Weg über d-Milchsäure, aller Wahrscheinlichkeit nach unter intermediärer Bildung von optisch aktivem Glycerinaldehyd[2]).

Auf dem Umwege über Glycerin könnte also möglicherweise (d. h. wenn auch die unnatürliche Komponente des Glycerinaldehyds zu Glycerin reduziert werden kann) auch d-l-Glycerinaldehyd natürliche Milchsäure bilden. Vielleicht wurde die Milchsäure in den in einer früheren Arbeit beschriebenen Leberdurchblutungsversuchen mit d-l-Glycerinaldehyd zum Teil auf dem Umweg über Glycerin gebildet und trat auch deswegen die unnatürliche Komponente der Milchsäure in den Leberdurchblutungsversuchen weniger in den Vordergrund, als in den Versuchen mit gewaschenen Blutkörperchen.

Auch die bei der Leberdurchblutung allem Anschein nach auftretende Bildung von natürlicher Milchsäure aus Dioxyaceton, die, wie wir in einer voranstehenden Arbeit hervorhoben, durch direkte Umlagerung des Dioxyacetons zu natürlicher Milchsäure oder natürlichem Glycerinaldehyd erklärbar sein könnte, ist vielleicht ganz oder teilweise durch intermediäre Reduktion des Dioxyacetons zu Glycerin bedingt.

Das wesentlichste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß Glycerinaldehyd durch lebensfrischen Organbrei und in der künstlich durchbluteten Leber in Glycerin umgewandelt werden kann.

Da Glycerinaldehyd allem Anscheine nach in größter Menge beim Abbau des Traubenzuckers im tierischen Organismus entsteht, dürfte hiermit die wesentlichste Quelle des vom Tierkörper neugebildeten Glycerins aufgeklärt sein.

---

[1]) S. Oppenheimer, diese Zeitschr. 45, 42, 1912.

[2]) Embden, Baldes und Schmitz, diese Zeitschr. 45, 124, 1912.

Über den Abbau der Brenztraubensäure im Tierkörper.

Von

Gustav Embden und Max Oppenheimer.

(Aus dem städtischen chemisch-physiologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 14. Juli 1912.)

In einer voranstehenden Arbeit[1]) wurde gezeigt, daß Glycerinaldehyd durch lebensfrische Blutkörperchen und in der künstlich durchströmten Leber mit außerordentlicher Leichtigkeit in Milchsäure umgewandelt wird. Wir gelangten zu der Anschauung, daß die Milchsäurebildung aus Traubenzucker, die für den Organismus des Säugetieres wenigstens fraglos auf dem Hauptwege des Traubenzuckerabbaues gelegen ist, im wesentlichen erfolgt unter intermediärer Bildung von natürlichem Glycerinaldehyd, der dann, ohne daß das mittlere Kohlenstoffatom seine asymmetrische Beschaffenheit verliert, direkt in natürliche Milchsäure umgelagert wird.

Trifft diese Anschauung zu, so ist, wie in der eben erwähnten Arbeit hervorgehoben wurde, die Umwandlung des Traubenzuckers in Rechtsmilchsäure in weitgehender Weise aufgeklärt, und die Frage des Kohlenhydratabbaues im Tierkörper wird zurückgeführt auf das Problem des Abbaues der Milchsäure.

Kürzlich unter der Leitung des einen von uns ausgeführte Untersuchungen von Hanni Fellner[2]) haben gezeigt, daß in der Leber abgelagertes Glykogen und dem Blute zugesetztes

---

[1]) Embden, Baldes und Schmitz, diese Zeitschr. **45**, 108, 1912.

[2]) H. Fellner, Bildung von Alanin aus Glykogen. Diese Zeitschr. **38**, 414, 1912.

milchsaures Ammoniak bei der künstlichen Durchströmung der Leber umgewandelt wird in natürliches Alanin.

Die von Knoop[1]) ausgeführten Fütterungsversuche an der γ-Phenyl-α-Ketobuttersäure, sowie die von Embden und Schmitz[2]) und von Kura Kondo[3]) unternommenen Leberdurchblutungsversuche mit verschiedenen aliphatischen und aromatischen α-Ketosäuren in Form ihrer Ammoniaksalze lassen es in hohem Maße wahrscheinlich erscheinen, daß die synthetische Bildung von α-Aminosäuren im Tierkörper gebunden ist an das Vorhandensein einer α-Ketogruppe, ganz entsprechend der von O. Neubauer und seinen Mitarbeitern in ihren schönen Untersuchungen festgestellten Tatsache, daß beim Abbau der Aminosäuren unter Desaminierung als erstes faßbares Produkt α-Ketosäuren auftreten.

Wenn dem Durchblutungsblute zugefügte oder bei der Durchblutung aus Glykogen gebildete Milchsäure in Alanin umgewandelt wird, so ist nach dem eben Gesagten anzunehmen, daß die Umwandlung auf dem Wege über Brenztraubensäure erfolgt. Sonach ist in den Untersuchungen von H. Fellner ein gewichtiger Anhaltspunkt dafür gegeben, daß die Brenztraubensäure ein Umwandlungsprodukt der Kohlenhydrate ist wie kürzlich auch von Abderhalden[4]) in Übereinstimmung mit der von uns selbst unsern Versuchen gegebenen Deutung hervorgehoben wurde.

Die eingangs erwähnten Untersuchungen von Embden Baldes und Schmitz machen es in höchstem Maße wahrscheinlich, daß die beim Kohlenhydratabbau gebildete Brenztraubensäure ein Oxydationsprodukt primär gebildeter Milch säure ist.

Nach den Untersuchungen von O. Neubauer kann umgekehrt kaum ein Zweifel daran bestehen, daß die nach Ver-

---

[1]) Fr. Knoop, Über den physiologischen Abbau der Säuren und die Synthese einer Aminosäure im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 489, 1910.

[2]) Embden und Schmitz, Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. Diese Zeitschr. 29, 423, 1910 und 38, 393, 1912.

[3]) Kura Kondo, Die Bildung körperfremder Aminosäuren. Diese Zeitschr. 38, 407, 1912.

[4]) E. Abderhalden, Fütterungsversuche mit Ammmonsalzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 1, 1912.

fütterung von Alanin an Kaninchen mit dem Harn ausgeschiedene[1]) und die bei der künstlichen Durchblutung der glykogenfreien Leber unter Alaninzusatz[2]) gebildete Milchsäure durch sekundäre Reduktion von Brenztraubensäure entsteht.

Milchsäure und Brenztraubensäure müssen also im tierischen Organismus mit ähnlicher Leichtigkeit ineinander übergehen, wie es für die β-Oxybuttersäure und die Acetessigsäure durch die Untersuchungen einer Reihe von Autoren erwiesen ist.

Die Brenztraubensäure ist nach dem eben Gesagten als ein Abbauprodukt nicht nur der Kohlenhydrate, sondern auch des Alanins aufzufassen, und es ist von vornherein sehr wahrscheinlich, daß Brenztraubensäure bei ihrem Abbau im tierischen Organismus dieselben Schicksale erleidet, wie α-Ketosäuren, resp. deren Muttersubstanzen, die α-Aminosäuren überhaupt.

Durch frühere Untersuchungen von Embden, Salomon und Schmidt[3]), Baer und Blum[4]), O. Neubauer[5]), Knoop[6]), Friedmann und Maase[7]) u. a. wissen wir, daß α-Aminosäuren und, wie O. Neubauer zuerst feststellte, ganz ebenso auch α-Ketosäuren, im Tierkörper umgewandelt werden in die um ein Kohlenstoffatom ärmeren Fettsäuren.

Hiernach würde bei ihrer weiteren Oxydation Brenztraubensäure umgewandelt werden in Essigsäure.

Wie O. Neubauer und K. Fromherz[8]) sehr mit Recht hervorheben, ist bei der Umwandlung der α-Ketosäuren zu der nächst niederen Fettsäure die Annahme des Aldehyds als intermediäres Produkt kaum zu umgehen.

---

[1]) Neuberg und Langstein, Ein Fall von Desamidierung im Tierkörper. Arch. f. Anat. u. Physiol. Abt. f. Physiol. **1903**, Suppl., S. 514.

[2]) Embden und Kraus, Beitrag zur Lehre vom Abbau der Kohlenhydrate im Tierkörper. 26. Kongr. f. inn. Med., Wiesbaden **1909**.

[3]) Embden, Salomon und Schmidt, Quellen des Acetons. Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. **8**, 140, 1906.

[4]) I. Baer und L. Blum, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **55**, 89, 1906.

[5]) O. Neubauer, Deutsches Arch. f. klin. Med. **95**, 211, 1909.

[6]) Fr. Knoop, a. a. O.

[7]) Friedmann und Maase, diese Zeitschr. **27**, **97**, **1910**.

[8]) O. Neubauer und K. Fromherz, Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Zeitschr. f. physiol Chem. **70**, 349, 1911.

Aus Brenztraubensäure würde dementsprechend Acetaldehyd entstehen nach der Formel[1]):

$$CH_3COCOOH = CH_3C\begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow H \end{matrix} + CO_2.$$

Die Bildung von Acetaldehyd aus Milchsäure ist auch von Lusk[2]) diskutiert worden.

Namentlich aber hat C. Spiro[3]) schon vor längerer Zeit (unabhängig von der Frage der Brenztraubensäurebildung aus Milchsäure) der Anschauung, daß Milchsäure durch oxydativen Abbau zu Acetaldehyd umgewandelt werden könnte, Ausdruck verliehen, und

Spiro und Magnus-Levy machten diese Anschauung zum Ausgangspunkt einer theoretischen Betrachtung über synthetische Bildung von Buttersäure aus Acetaldehyd unter intermediärer Bildung von Crotonaldehyd.

---

[1]) Daß der Abbau der Aminosäuren durch Hefe zu den den Aminosäuren entsprechenden Alkoholsäuren sowie zu den nächst niederen Alkoholen führt, war schon durch die Untersuchungen von F. Ehrlich festgestellt worden. Neubauer und Fromherz gelang es, den Nachweis zu führen, daß die Bildung der Alkoholsäuren auch bei der Hefegärung ihren Weg über die α-Ketosäuren nimmt, aus denen die nächst niederen Alkohole auf dem Umwege über die Aldehyde entstehen. Aus Alanin würde also hiernach durch Hefe über Brenztraubensäure Acetaldehyd und Äthylalkohol entstehen.

Die Frage, ob auch der bei der Hefegärung aus Zucker gebildete Alkohol auf dem Wege über Brenztraubensäure und Acetaldehyd entsteht, ist von Neuberg und seinen Mitarbeitern, sowie auch von O. Neubauer experimentell bearbeitet worden. Neuberg fand, daß Brenztraubensäure durch Hefe und Hefepreßsaft in Kohlensäure und Acetaldehyd gespalten wird. Bei Anwendung brenztraubensaurer Salze erhielt er statt Acetaldehyd Aldol.

In einer jüngst erschienenen Arbeit teilen Neuberg und Kerb mit, daß beim Stehen von Hefe bei gleichzeitigem Zusatz von äquivalenten Mengen Brenztraubensäure und Glycerin erheblich mehr Alkohol gebildet wird, als in einem entsprechenden Leerversuch. Eine bestimmte Deutung geben Neuberg und Kerb vorläufig diesen Versuchen nicht (C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, Heft 2, 1912. Daselbst siehe auch die Hinweise auf die übrigen hier in Betracht kommenden Arbeiten Neubergs und seiner Mitarbeiter).

Auch Neubauer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 350, 1911) konnte feststellen, daß Brenztraubensäure leicht vergärbar ist,

[2]) Lusk, Ernährung und Stoffwechsel, Wiesbaden 1910, S. 281.

[3]) C. Spiro, zit. nach Magnus-Levy, Arch f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42, 226, 1899.

Friedmann[1]) gelang es dann, mittels der Methode der Leberdurchblutung den direkten Nachweis zu erbringen, daß Acetaldehyd, oder wenigstens Acetaldehydammoniak vom Organismus in Acetessigsäure umgewandelt werden kann, und er machte es wahrscheinlich, daß hierbei zunächst Aldol entsteht, nach folgendem Schema:

$$CH_3C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{matrix} + CH_3C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{matrix} = CH_3CHOHCH_2C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{matrix}$$

Acetaldehyd Aldol

$$CH_3CHOHCH_2C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow H\end{matrix} \longrightarrow CH_3CHOHCH_2COOH \longrightarrow CH_3COCH_2COOH$$

Aldol β-Oxybuttersäure Acetessigsäure

In einer voranstehenden Arbeit von Masuda[2]) wurde ferner gezeigt, daß auch Äthylalkohol Acetessigsäure zu bilden vermag, allem Anschein nach unter intermediärer Bildung von Acetaldehyd.

Nach den eben besprochenen Versuchsergebnissen von E. Friedmann und namentlich von Masuda lag es sehr nahe, zu untersuchen, ob auch Brenztraubensäure in der isolierten Leber Acetessigsäure zu bilden vermag.

Bevor wir zur Besprechung unserer Versuche übergehen, wollen wir noch erwähnen, daß das Verhalten der Brenztraubensäure im Tierkörper in jüngster Zeit durch Paul Mayer[3]) einer experimentellen Prüfung unterzogen wurde.

Mayer fand, daß normal ernährte Kaninchen nach subcutaner Zufuhr größerer Mengen von Brenztraubensäure in Form ihres Natriumsalzes außer Traubenzucker und unveränderter Brenztraubensäure auch d-l-Milchsäure ausscheiden. Möglicherweise trat auch die unnatürliche l-Form der Milchsäure auf.

Bei Hungerkaninchen bewirkte die Brenztraubenzufuhr keine oder nur eine sehr geringfügige Zuckerausscheidung, hingegen einen vermehrten Glykogengehalt der Leber.

In allen von Mayer angestellten Versuchen trat deutliche Hyperglykämie ein, bei den normal ernährten Tieren war diese ausgesprochener als bei den Hungertieren.

Die von den Kaninchen ausgeschiedene d-l-Milchsäure hält Mayer

---

[1]) E. Friedmann, Über eine Synthese der Acetessigsäure bei der Leberdurchblutung. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 202, 1908.

[2]) Niro Masuda, diese Zeitschr. **45**, 140, 1912.

[3]) P. Mayer, Über Brenztraubensäureglucosurie und über das Verhalten der Brenztraubensäure im Tierkörper. Diese Zeitschr. **40**, 441, 1912.

für ein Derivat der zugeführten Brenztraubensäure, während er die Frage der Ursache der Glucosurie offen läßt.

Wir haben eine größere Anzahl von Leberdurchblutungsversuchen unter Brenztraubensäurezusatz angestellt, bei deren Ausführung wir uns an die früher befolgte Methodik hielten.

Wir bedienten uns auch hier des Mandelschen Durchblutungsapparates[1]).

Die Brenztraubensäure wurde in verschiedenen Mengen dem Durchblutungsblute zugesetzt und teils mit Ammoniak, teils mit Natronlauge neutralisiert. In Versuch 11 und 12 setzten wir der Brenztraubensäure annähernd das Doppelte der ihr äquivalenten Menge Natriumbicarbonat hinzu, in der Absicht, die Aldolkondensation von etwa auftretendem Acetaldehyd zu begünstigen.

Da die Brenztraubensäure mit Wasserdampf flüchtig ist und Jod bindet, war es nötig, das erste bei saurer Reaktion gewonnene Destillat einer Redestillation aus alkalischer Lösung zu unterwerfen. Wir haben uns davon überzeugt, daß Zusatz von Brenztraubensäure zu einem nach Schenck gewonnenen Blutfiltrat, wenn man alkalisch redestilliert, ohne Einfluß auf das Ergebnis der jodometrischen Bestimmung ist.

Die von uns ausgeführten Versuche sind in der umstehenden Tabelle in der Reihenfolge, in der sie vorgenommen wurden, zusammengestellt[2]).

Die Kolonnen 2 bis 6 dieser Tabelle enthalten die notwendigen Einzelheiten der Versuchsanordnung. Aus Kolonne 7 ist die Menge des pro Liter des Durchblutungsblutes neugebildeten Acetons ersichtlich.

Von den 12 Versuchen der Tabelle zeigen 5, nämlich Versuch 1, 4, 8, 9 und 10 keine oder keine merkliche Mehrbildung von Aceton gegenüber Leerversuchen. (Wir erinnern daran, daß der früher von uns festgestellte Maximalwert der

---

[1]) Mit sehr gutem Erfolge benutzen wir neuerdings eine Pumpe, deren Zylinder und Kolben nach dem Prinzip einer Rekordspritze konstruiert sind und die sich im Betriebe in Bezug auf Sauberkeit und Sicherheit des Arbeitens außerordentlich bewährt.

[2]) Die beiden ersten Versuche wurden von dem einen von uns gemeinsam mit Herrn Dr. Ohta, der an einer weiteren Verfolgung der Arbeit verhindert war, vorgenommen.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr. des Versuchs-	Gewicht d. Hundes kg	Gewicht der Leber g	Menge Rinder-blut ccm	Dauer der Durchblutg. Min.	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Substanz	Gebild. Menge Aceton pro Liter Durchblutungsblut mg	Bemerkungen
1	8,7	270	1600	60	5 g Brenztraubensäure mit Ammoniak neutralisiert	26	
2	7,0	180	1600	60	2 g Brenztraubensäure mit Ammoniak neutralisiert	50	
3	7,7	140	1600	60	6,7 g Brenztraubensäure mit Ammoniak neutralisiert	53	Hungerhund.
4	6,5	140	1600	60	2 g Brenztraubensäure m. Natronlauge neutralisiert	30	Aus 3000 ccm Filtrat wurden 0,04 g Dibenzalaceton gewonnen.
5	6,8	190	1600	60	6 g Brenztraubensäure m. Natronlauge neutralisiert	55	
6	5,5	140	1600	60	6 g Brenztraubensäure m. Natronlauge neutralisiert	44	
7	9,5	210	1600	60	6 g Brenztraubensäure m. Natronlauge neutralisiert	46	
8	5,7	135	1600	60	6 g Brenztraubensäure m. Natronlauge neutralisiert	34	Hungerhund.
9	6,2	165	1600	60	6 g Brenztraubensäure mit Ammoniak neutralisiert	29	
10	5,2	135	1600	60	6 g Brenztraubensäure, 12 g Natriumbicarbonat in 110 ccm Wasser	29	
11	5,2	165	1600	74	6 g Brenztraubensäure, 12 g Natriumbicarbonat in 120 ccm Wasser	82	
12	7,8	195	2000	120	8 g Brenztraubensäure mit Ammoniak neutralisiert	79	Acetonbildung nach 30 Min.: 58 mg, n. 60 Min.: 67 mg, n. 90 Min.: 79 mg pro Liter.

Acetonbildung in Leerversuchen bei der von uns gewählten Versuchsanordnung 27 mg pro Liter beträgt.)

In den übrigen 7 Versuchen ist aber eine deutliche Steigerung der Acetonbildung eingetreten. In 5 Versuchen, nämlich in Versuch 2, 3, 5, 11 und 12 beträgt die Acetonbildung pro Liter 50 mg oder mehr. Besonders groß ist sie in Versuch 11 (82 mg pro Liter). Dieser Versuch dauerte 74 Minuten, was nach den Bedingungen, unter denen wir früher die Standardzahlen für Leerversuche ermittelten, durchaus statthaft ist.

In Versuch 12, der ebenfalls eine sehr starke Acetessigsäurebildung aufweist, betrug die Dauer der Durchblutung 120 Minuten; die am Ende des Versuchs vorgenommene Acetonbestimmung ist also nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen der übrigen Versuche vergleichbar. Doch war in Versuch 12 bereits nach 60 Minuten, wie die Untersuchung einer Probeentnahme von 150 ccm Blut ergab, die Acetonbildung gleich 67 mg pro Liter. (Nach 30 Minuten betrug sie 58 mg, und hatte nach 90 Minuten den vollen, nach 120 Minuten gefundenen Betrag von 79 mg erreicht.) Also auch in diesem Versuch erwies sich Brenztraubensäure als kräftiger Acetessigsäurebildner.

Die Acetonbildung in den Versuchen 6 und 7 (44 bzw. 46 mg pro Liter) liegt durchaus außerhalb der in überaus zahlreichen von uns angestellten Versuchen ohne Zusatz oder unter Zusatz nicht acetessigsäurebildender Substanzen jemals erhaltenen Werte.

In Versuch 5 (Acetonbildung 55 mg pro Liter) wurde die aus 3000 ccm Filtrat unter den früher von Embden und Kalberlah[1]) geschilderten Bedingungen erhältliche Menge Dibenzalaceton festgestellt. Es wurden 0,04 g gewonnen, d. h. des Doppelte der bei Leerversuchen erhaltenen Ausbeute.

Trotz des schwankenden Verhaltens der Einwirkung der Brenztraubensäure möchten wir nicht zögern, ihr die Fähigkeit zuzuerkennen, unter geeigneten Bedingungen Acetessigsäure zu bilden, fraglos wohl unter intermediärer Bildung von Acetaldehyd.

---

[1]) Embden und Kalberlah, Über Acetonbildung in der Leber. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 121, 1906.

Wir fühlen uns um so mehr dazu berechtigt, Brenztraubensäure als Acetessigsäurebildner anzusehen, als auch Äthylalkohol nach den Ergebnissen von Masuda nicht mit derselben Sicherheit, wie z. B. n-Buttersäure oder Isovaleriansäure Acetessigsäure bilden. Und wir glauben für die wechselnde Einwirkung der Brenztraubensäure auf die Acetessigsäurebildung in der durchbluteten Leber dieselbe Erklärung geben zu dürfen, die schon gelegentlich des ähnlichen Verhaltens des Äthylalkohols in der Arbeit von Masuda versucht wurde, daß nämlich die Aldolkondensation des aus Brenztraubensäure (wie auch aus Alkohol) gebildeten Acetaldehyds nur eine Nebenreaktion ist, die unter Bedingungen eintritt, die wir noch nicht beherrschen.

Die Hauptreaktion, die sich an dem aus Äthylalkohol und Brenztraubensäure gebildeten Acetaldehyd abspielt, dürfte seine Oxydation zu Essigsäure sein.

Beim Äthylalkohol war es von vornherein ganz außerordentlich wahrscheinlich, daß sein Abbau im Tierkörper unter intermediärer Bildung von Acetaldehyd erfolgt, und in Versuchen von Masuda ließ sich ein aldehydartiger Körper neben dem Aceton mit Sicherheit nachweisen.

Die Anwendung des von Masuda beschriebenen Silberoxydverfahrens lieferte in den Versuchen dieser Arbeit kein ganz einheitliches Ergebnis. Jedenfalls war die Menge aldehydartiger Substanz weitaus geringer als in den von Masuda unter Alkoholzusatz angestellten Versuchen.

In verschiedenen vorausgehenden Arbeiten haben wir uns zu zeigen bemüht, daß die Milchsäurebildung aus Kohlenhydraten einen auf dem Hauptwege des Kohlenhydratabbaus im tierischen Organismus gelegenen Vorgang darstellt, und wir müssen es für überaus wahrscheinlich halten, daß auch die Oxydation der Milchsäure zur Brenztraubensäure nicht eine Nebenreaktion ist, sondern eine Stufe auf dem Hauptwege des Milchsäureabbaus bildet.

Gegen die letztere Auffassung haben sich — in einer soeben erschienenen Arbeit — Parnas und Baer[1]) gewendet. Sie gelangten zu der Anschauung, daß die Bildung von Brenztraubensäure höchstens einen Nebenweg beim Milchsäureabbau darstellen kann, einmal auf Grund von Versuchen über die

[1]) I. Parnas und I. Baer, Über Zuckerabbau und Zuckeraufbau im tierischen Organismus. Diese Zeitschr. 41, 386, 1912.

Einwirkung von Milchsäure und verschiedenen anderen Substanzen (auch Brenztraubensäure) auf die Zuckerausscheidung phlorizinvergifteter Kaninchen und auf die Glykogenbildung in der künstlich durchströmten Schildkrötenleber.

Zu einem anderen Teil werden Parnas und Baer zu ihrer eben erwähnten Auffassung durch Überlegungen mehr theoretischer Art geführt. Sie gehen bei diesen Überlegungen aus von der früher durch Embden und Salomon[1]) am pankreaslosen Hunde festgestellten und namentlich von Mandel und Lusk[2]) an phlorizinvergifteten Tieren systematisch verfolgten Tatsache, daß Milchsäure ein Zuckerbildner ist.

Mit Recht heben Parnas und Baer hervor, daß wir die Zuckerbildung aus Milchsäure nicht mit dem Abbau der Milchsäure in Zusammenhang brachten, sondern uns vorstellten, daß aus zwei Molekülen Milchsäure wieder ein Molekül Glucose entsteht[3]).

Über den bei dieser Rückverwandlung von Milchsäure in Glucose in Frage kommenden Chemismus äußerten wir keine bestimmten Vorstellungen, dies geschah aber durch Porges[4]), der die Umwandlung von Säuren in die isomeren Oxyaldehyde in Erwägung zog: aus Milchsäure würde hiernach durch direkte Umlagerung Triose entstehen können.

Eine derartige Umlagerung von Milchsäure in Triose[5]) erscheint nun nach Parnas und Baer sicher ausgeschlossen.

Es würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, wenn

[1]) G. Embden und Salomon, Über Alaninfütterungsversuche am pankreaslosen Hunde. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 5, 507, 1904.

[2]) Mandel und Lusk, Lactic acid in intermediary metabolism. Am. Journ. of Physiol. 16, 189, 1906.

[3]) C. v. Noorden und G. Embden, Centralbl. f. d. Physiol. d. Stoffwechsels, N. F. 1, 2, 1906.

[4]) O. Porges, Über den Abbau der Fettsäuren im Organismus. Ergebnisse d. Physiol. 10, 46, 1910.

[5]) Parnas und Baer sprechen, wohl auf Grund der von A. Wohl entwickelten Vorstellungen über den Chemismus der Milchsäurebildung aus Traubenzucker, von einer Umwandlung der Milchsäure in Methylglyoxal, das als Zwischenprodukt bei der im Tierkörper erfolgenden Milchsäurebildung aus Traubenzucker, wenigstens soweit dieselbe ihren Weg über Glycerinaldehyd nimmt, aber kaum in Betracht kommen dürfte.

wir die Gründe, die nach Parnas und Baer gegen eine direkte Umlagerung von Milchsäure in Methylglyoxal (bzw. Glycerinaldehyd, siehe Anmerkung) sprechen, hier ganz im einzelnen erörtern wollten. Wir wollen daher nur diejenigen Punkte erwähnen, denen anscheinend nach dem Urteil von Parnas und Baer ganz besondere Beweiskraft zukommt. Das Hauptbedenken, das Parnas und Baer gegen die direkte Umwandlung von Milchsäure in Triose erheben, ist energetischer Natur: sie weisen darauf hin, daß die Überführung von 2 Mol. Milchsäure in 1 Mol. Glucose mit einem Aufwand von 25 Cal. verbunden ist. Schon deshalb kommt diese Umlagerung für den Betriebsstoffwechsel nach ihnen nicht in Betracht.

Dieser Auffassung möchten wir von vornherein mit aller Bestimmtheit entgegentreten. Daß endotherm verlaufende Reaktionen im Tierkörper vorkommen, kann unseres Erachtens gar keinem Zweifel unterliegen. Wir geben Parnas und Baer vollkommen recht, wenn sie hervorheben, daß jeder Reduktionsprozeß im tierischen Organismus — und übrigens auch außerhalb desselben — unvollständig erforscht ist, so lange man nicht weiß, welche Körper dabei oxydiert sind. Aber diese Unvollkommenheit unserer Kenntnisse darf uns nicht veranlassen, von vornherein solche Reaktionen, die einen großen Wärmeverbrauch erheischen, für den Tierkörper nicht in Betracht zu ziehen.

Wenn Parnas und Baer wegen der Größe des für die direkte Umwandlung von Milchsäure in Triose bzw. Glucose notwendigen Calorienaufwandes die Möglichkeit des Vorkommens dieser Reaktion im Tierkörper ablehnen, so kommen wir, gerade unter Berücksichtigung der obwaltenden energetischen Verhältnisse, zu einem durchaus entgegengesetzten Standpunkte.

Bereits vor längerer Zeit haben wir auf Grund von Leberdurchblutungsversuchen, in denen die Milchsäurebildung aus Kohlenhydrat erwiesen wurde, und auf Grund der oben erwähnten Fütterungsversuche am pankreaslosen Hunde, in denen Milchsäure sich als Zuckerbildner erwies, die Regeneration der Milchsäure zu Zucker mit der Muskeltätigkeit in Zusammenhang gebracht[1]).

---

[1]) v. Noorden und Embden, a. a. O.

Den früher von Minkowski erhobenen Befund, daß nach Ausschaltung der Leber der Blutzucker schwindet, hingegen Milchsäure in reichlicher Menge auftritt, sahen wir als Hinweis darauf an, daß als Ort der Zuckerregeneration aus Milchsäure die Leber anzusehen ist, wofür übrigens auch die von Parnas und Baer an der Schildkrötenleber unter Milchsäurezusatz vorgenommenen Durchblutungsversuche sprechen.

Wir wissen, daß es bei der Muskeltätigkeit, namentlich bei angestrengter Muskeltätigkeit, zu einer Steigerung des Milchsäuregehaltes im Blute kommt. Diese Tatsache ist neuerlich wiederum von H. Fries[1]) im hiesigen Institute festgestellt worden. Fries fand im Durchschnitt zweier Versuche, die er am Menschen nach angestrengter Muskeltätigkeit anstellte, eine Steigerung der Blutmilchsäure auf nicht viel weniger als das Dreifache des Durchschnitts aus zahlreichen Ruhewerten. Wir dürfen es daher als durchaus wahrscheinlich ansehen, daß diese Milchsäure der tätigen Muskulatur entstammt.

Wir wissen ferner, daß die Muskeltätigkeit mit einer Steigerung der Wärmeproduktion verbunden ist, die oft einen solchen Grad erreicht, daß die normale Körpertemperatur beim arbeitenden Menschen nur durch vermehrte Wärmeabgabe unter Schweißsekretion erhalten werden kann oder gar die Körpertemperatur eine Steigerung erfährt.

Ganz besonders deutlich tritt die Überproduktion von Wärme bei angestrengter Muskeltätigkeit an Hunden hervor, bei denen, wie Weiland[2]) zeigte, schon nach kurzdauernder intensiver Arbeit im Tretrade Temperatursteigerungen bis auf weit über 40° vorkommen.

Würde die Regeneration der dem Muskel entströmenden Milchsäure zu Zucker, die allem Anschein nach in die Leber zu verlegen ist[3]), auf exothermem Wege erfolgen, wie Parnas und Baer es postulieren, so würde zu Zeiten starker Muskeltätigkeit die bereits durch die Muskelaktion über das im Sinne

---

[1]) H. Fries, Über das Vorkommen von Milchsäure im menschlichen Blute. Diese Zeitschr. **35**, 368, 1911. Siehe daselbst auch die ältere Literatur über diesen Gegenstand.

[2]) W. Weiland, Über den Einfluß ermüdender Muskelarbeit auf den Blutzuckergehalt. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **92**, 223, 1908.

[3]) v. Noorden und Embden, l. c.

der Wärmeökonomie erforderliche Maß gesteigerte Wärmeproduktion eine weitere Steigerung erfahren. Die bei der Umwandlung von Milchsäure in Zucker gebildete Wärme würde entweder den Wärmeverlust durch Schweißsekretion usw. steigern, oder im Sinne einer abnormen Erhöhung der Körpertemperatur mitwirken müssen.

Eine endotherm verlaufende Regeneration von Milchsäure zu Zucker würde hingegen der bei angestrengter Muskeltätigkeit über das Notwendige und Nützliche gesteigerten Wärmeproduktion entgegenwirken.

Der Organismus würde also unter den bei angestrengter Muskeltätigkeit gegebenen Bedingungen die bei einer exotherm verlaufenden Zuckerregeneration aus Milchsäure gebildete Wärme durch vermehrte Wärmeabgabe verlieren.

Verliefe der in Frage kommende Vorgang hingegen endotherm, so würde nicht nur der durch die Muskeltätigkeit über das Maß gesteigerten Wärmeproduktion entgegengewirkt, sondern auch sonst nutzlos als überproduzierte Wärme verloren gehende Energie als chemische Energie erhalten bleiben.

Wir möchten hier daran erinnern, daß die vom tätigen Muskel ans Blut abgegebene Milchsäure aller Voraussicht nach nicht nur durch Kohlenhydratabbau während der Muskeltätigkeit gebildet wird, sondern zu einem wesentlichen Teil dem Lactacidogen des Muskels — im Sinne einiger voranstehender Arbeiten — entstammen dürfte.

Je geringer die Muskeltätigkeit ist, um so weniger Milchsäure wird von der Muskulatur an das Blut abgegeben, in um so geringerem Umfange wird also auch eine endotherm verlaufende Regeneration von Milchsäure zu Zucker in der Leber in Betracht kommen.

Hiernach würden also vielleicht Muskulatur und Leber — bis zu einem gewissen Grade — alternierend bei der Wärmeproduktion für einander eintreten können.

Wir wollen die eben geäußerten Vorstellungen hier nicht weiter verfolgen, sondern nur nochmals betonen, daß gerade die Berücksichtigung der energetischen Verhältnisse eine endotherm verlaufende Regeneration von Zucker aus Milchsäure außerordentlich zweckmäßig erscheinen ließe.

Wir können nach dem Gesagten der von Parnas und

Baer geäußerten Anschauung, daß eine Überführung von zwei Molekülen Milchsäure in ein Molekül Traubenzucker für den Betriebsstoffwechsel nicht in Betracht kommt, nicht beipflichten.

Wenn die eben genannte Art der Umwandlung von Milchsäure in Traubenzucker im Tierkörper entgegen den von Parnas und Baer geäußerten Anschauungen verwirklicht wäre, so entfiele jede Notwendigkeit, einen anderen Weg für die Verwandlung von Milchsäure in Traubenzucker, insbesondere auch den von Parnas und Baer in Erwägung gezogenen, anzunehmen.

Wir möchten aber doch die Versuchsergebnisse von Parnas und Baer und namentlich die aus ihnen von den Autoren gezogenen Schlußfolgerungen einer kurzen Besprechung unterziehen.

Parnas und Baer stellten zunächst fest, daß Milchsäure, Glycerinsäure, Glykolaldehyd-Dicarbonsäure, Glykolaldehyd, sowie auch Äthylenglykol in der isolierten Schildkrötenleber Glykogen bilden, sowie zum größten Teil auch die Zuckerausscheidung phlorizinvergifteter Tiere steigern, während kein Zucker gebildet wurde aus β-Oxypropionsäure, α-Oxybuttersäure, Glykolsäure, Brenztraubensäure, α-β-Dioxybuttersäure und Glyoxylsäure.

Auf Grund dieser Versuche und auf der Basis der mehrfach erwähnten Anschauung, daß die direkte Umwandlung von Milchsäure in Triose unmöglich sei, gelangen Parnas und Baer zu der Anschauung, daß der oxydative Abbau der Glucose über Milchsäure, Glycerinsäure und Glykolaldehyd, von dem 3 Moleküle zu einem Glucose-Molekül zusammentreten, führt. So interessant die experimentellen Ergebnisse von Parnas und Baer sind, so wenig können wir ihnen Beweiskraft für die von den Autoren angenommene Reaktionsfolge des Zuckerabbaus beimessen. Denn weder Glycerinsäure, noch Glykolaldehyd, noch eine der als Zwischenprodukt zwischen Glycerinsäure und Glykolaldehyd in Betracht kommenden Substanzen konnte von ihnen isoliert werden, und ebensowenig ein charakteristisches Umwandlungsprodukt dieser Substanzen.

Die bloße Fähigkeit, Zucker zu bilden, kann, wie wir glauben, unmöglich als ein ausreichendes Beweismittel für den von den Autoren postulierten genetischen Zusammenhang der in Frage kommenden Substanzen angesehen werden. Wir

wollen ausdrücklich hervorheben, daß uns die Umwandlung von Glycerinsäure in Traubenzucker über Glykolaldehyd durchaus verständlich erscheint.

Die Oxydation von Milchsäure zu Glycerinsäure, d. h. die β-Oxydation einer in α-Stellung hydroxylierten Säure ist nicht nur, wie Parnas und Baer selbst hervorheben, im Organismus bisher nicht nachgewiesen, sondern widerspricht direkt allen bisher über den Abbau von α-Oxymonocarbonsäuren bekannten Tatsachen.

Wir müssen also die von Parnas und Baer für die Umwandlung der Milchsäure in Glucose angenommene Reaktionskette nicht nur für unbewiesen, sondern ein Glied in dieser Kette, und damit natürlich die ganze Kette als solche, für höchst unwahrscheinlich halten.

Parnas und Baer haben festgestellt, daß Brenztraubensäure unter den von ihnen gewählten Versuchsbedingungen keinen Zucker bildet. Das ist natürlich durchaus verständlich, wenn man annimmt, daß der Hauptweg von Brenztraubensäure zu Traubenzucker über Milchsäure geht und daß die Reduktion von Brenztraubensäure zu Milchsäure unter den in Frage kommenden Verhältnissen nicht in genügendem Ausmaß erfolgt.

Wenn die Anschauung, daß Brenztraubensäure eine auf dem Hauptwege des Milchsäureabbaues gelegene Oxydationsstufe darstellt, wofür vor allem die von H. Fellner (s. oben) erwiesene Bildung des charakteristsichen Brenztraubensäurederivates d-Alanin aus Kohlenhydraten und auch aus Milchsäure spricht, richtig ist, so dürfen wir in den Versuchen der vorliegenden Arbeit einen Hinweis auf das Schicksal des Traubenzuckers nach dem Passieren des Brenztraubensäurestadiums erblicken.

Die Acetessigsäurebildung aus Brenztraubensäure ist jedenfalls bei weitem am leichtesten erklärbar, wenn man als intermediäres Produkt Acetaldehyd annimmt, dessen Auftreten beim Abbau der Brenztraubensäure, wie bereits oben erwähnt, von vornherein in hohem Maße wahrscheinlich ist.

Der Abbau der Milchsäure würde sich, wenn die Schlußfolgerungen, die wir aus unseren Versuchen ziehen, richtig sind, in fast genau der Weise vollziehen, wie C. Spiro und Magnus-Levy es angenommen haben.

Acetaldehyd ist nach unseren Untersuchungen als ein wahrscheinlich beim Kohlenhydratabbau in größter Menge auftretendes normales Stoffwechselprodukt anzusehen und dürfte als die Muttersubstanz nicht nur eines Teiles der im Tierkörper gebildeten Essigsäure, sondern namentlich auch auf Grund der Untersuchungen von Batelli und Stern[1]), Parnas[2]), sowie Embden und Baldes[3]) als Muttersubstanz des vom tierischen Organismus offenbar dauernd in geringer Menge gebildeten Äthylalkohols zu betrachten sein.

Es sei uns nun gestattet, einen kurzen Rückblick auf die im Voranstehenden niedergelegten Arbeiten zu werfen, um namentlich zu versuchen, ein zusammenhängendes Bild von den Schicksalen, die der Traubenzucker bei seinem Abbau im Tierkörper erfährt, zu gewinnen.

Als völlig sichergestellte Tatsache dürfen wir sowohl auf Grund von Durchblutungsversuchen an der Leber als auch gestützt auf Versuche an gewaschenen Blutkörperchen als den Hauptabbauweg des Traubenzuckers den über d-Milchsäure führenden ansehen.

Als Zwischenprodukt zwischen Traubenzucker und Milchsäure kommt mit größter Wahrscheinlichkeit in erster Linie Glycerinaldehyd in Frage, der sich in Durchblutungsversuchen und in Versuchen mit Blutkörperchen als ein Milchsäurebildner von ganz besonderer Stärke erwies.

Demgegenüber kommt dem Dioxyaceton offenbar entweder keine oder nur eine untergeordnete Bedeutung bei der Milchsäurebildung aus Traubenzucker zu.

Da die optische Beschaffenheit der aus Glycerinaldehyd entstehenden Milchsäure mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit bestimmt wird durch das optische Verhalten des Glycerinaldehyds, muß bei der Umlagerung von natürlichem Glycerinaldehyd in d-Milchsäure das mittlere Kohlenstoffatom des Glycerinaldehyds seine asymmetrische Beschaffenheit dauernd beibehalten. Substanzen ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom, wie Methylglyoxal oder Brenztraubensäure

---

[1]) Batelli und Stern, Bull. de Soc. Biol. **1910**.

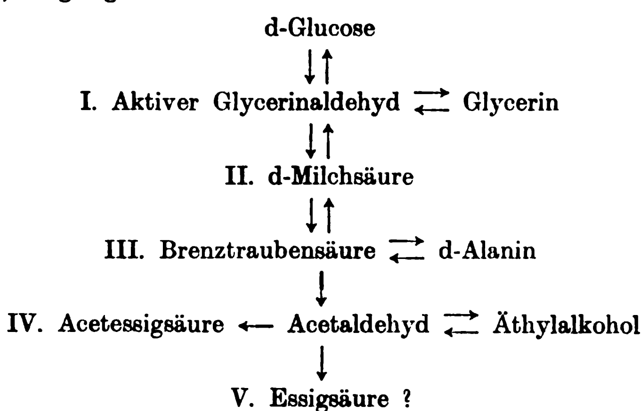
[2]) Parnas, diese Zeitschr. 28, 274, 1910.

[3]) G. Embden und K. Baldes, diese Zeitschr. **45**, 157, 1912.

können demnach als intermediär auftretende Produkte bei der Umwandlung von natürlichem Glycerinaldehyd in d-Milchsäure nicht in Betracht kommen.

Die Umlagerung von natürlichem Glycerinaldehyd in d-Milchsäure dürfte demnach durch einfache Oxydation der Aldehydgruppe auf Kosten des Sauerstoffes der primären Alkoholgruppe erfolgen.

In das nachstehende Schema des Traubenzuckerabbaues im Tierkörper, wie er sich aus unseren Untersuchungen zu ergeben scheint, haben wir als erste Abbaustufe des Traubenzuckers den Glycerinaldehyd eingetragen. Wir stellen uns hierbei vor, daß die d-Glucose in 2 Mol. optisch aktiven Glycerinaldehyd zerfällt, der dann direkt zur zweiten Abbaustufe, der d-Milchsäure, umgelagert wird.



Der weitere Abbau der d-Milchsäure führt nun zur Brenztraubensäure, was aus der Alaninbildung aus Glykogen und aus Milchsäure in der durchbluteten Leber geschlossen wird. In das Schema ist dementsprechend Brenztraubensäure als dritte Abbaustufe eingetragen.

Brenztraubensäure bildet in der künstlich durchbluteten Leber Acetessigsäure. Der Weg zur Acetessigsäure führt offenbar über Acetaldehyd, den wir in dem Schema als vierte Abbaustufe bezeichnen.

Die vielleicht unter Aldolkondensation erfolgende Acetessigsäurebildung aus dem aus Brenztraubensäure gebildeten Acetaldehyd sehen wir nur als eine Nebenreaktion an.

Die Hauptreaktion des Acetaldehydabbaues dürfte zur Essigsäure führen, wofür der Beweis noch aussteht.

Drei der Abbaustufen des Traubenzuckers enthalten Carbonylgruppen: der Glycerinaldehyd, die Brenztraubensäure, der Acetaldehyd.

An diesen 3 Substanzen spielen sich Reaktionen ab, die im Sinne der schließlichen Oxydation des Traubenzuckers zu Kohlensäure und Wasser als Nebenreaktionen zu bezeichnen sind, denen aber trotzdem hohe biologische Bedeutung zukommen dürfte.

Glycerinaldehyd wird durch lebensfrischen Organbrei und in der künstlich durchbluteten Leber zu einem Teil in Glycerin umgewandelt. Er dürfte die Hauptquelle für das vom Tierkörper neugebildete Glycerin bilden. In das Schema haben wir das Glycerin seitlich vom Glycerinaldehyd eingetragen.

Aus Brenztraubensäure bildet sich in der künstlich durchbluteten Leber d-Alanin. Während Glycerinaldehyd also mit großer Leichtigkeit in einen charakteristischen Bestandteil des Neutralfettes übergeht, kann Brenztraubensäure in einen weitverbreiteten Komplex des Eiweißmoleküls umgewandelt werden.

Der Acetaldehyd bildet, wie E. Friedmann zuerst gezeigt hat, in der künstlich durchbluteten Leber Acetessigsäure. Wenn Acetaldehyd, wie es den Anschein hat, ein in größter Menge auftretendes normales Abbauprodukt der Kohlenhydrate ist, so dürfen wir diese Substanz vielleicht, entsprechend den Gedankengängen früherer Autoren, als den Ausgangspunkt der Fettsäuresynthese aus Kohlenhydraten betrachten.

Acetaldehyd wird, wie es bereits durch die früheren Untersuchungen von Batelli und Stern, sowie namentlich von J. Parnas wahrscheinlich war, durch lebensfrischen Organbrei sowie in der künstlich durchbluteten Leber zum Teil in Äthylalkohol übergeführt. Ist Acetaldehyd ein normales Abbauprodukt der Kohlenhydrate, so ist damit die Herkunft des vom Tierkörper anscheinend dauernd in geringer Menge gebildeten Äthylalkohols aufgeklärt.

Hier sei nochmals daran erinnert, daß neuerlich C. Neuberg und seine Mitarbeiter sowie auch O. Neubauer die Vorstellung, daß bei der Hefegärung die Alkoholbildung auf dem Wege über Brenztraubensäure und Acetaldehyd erfolgt, einer experi-

mentellen Prüfung unterzogen haben, und daß Neuberg bei der Vergärung freier Brenztraubensäure Acetaldehyd und Kohlensäure, bei der Vergärung brenztraubensaurer Salze Aldol und Kohlensäure erhielt.

Wir haben bisher die am Traubenzucker und seinen Umwandlungsprodukten sich abspielenden Vorgänge nur in einer Richtung verfolgt, und wollen nunmehr untersuchen, wie weit auch der umgekehrte Ablauf dieser Reaktionen im Tierkörper verwirklicht ist.

Glycerin ist in der künstlich durchbluteten Leber ein starker Bildner von d-Milchsäure, und es ist außerordentlich wahrscheinlich, daß diese Milchsäurebildung erfolgt unter intermediärem Auftreten von natürlichem Glycerinaldehyd. Wir haben daher in das Schema unter den vom Glycerinaldehyd zum Glycerin führenden Pfeil einen in umgekehrter Richtung zeigenden eingetragen.

Aus früher bereits erwähnten, noch nicht abgeschlossenen Versuchen scheint hervorzugehen, daß Glycerinaldehyd in der künstlich durchbluteten glykogenarmen Hundeleber in Zucker umgewandelt wird, welchen Vorgang der vom Glycerinaldehyd zur d-Glucose zeigende Pfeil andeuten soll.

Die namentlich von Lüthje nachgewiesene Zuckerbildung aus Glycerin dürfte aller Voraussicht nach ihren Weg, ebenso wie die Milchsäurebildung aus Glycerin, über Glycerinaldehyd nehmen.

Alanin geht, wie durch Fütterungsversuche von C. Neuberg und L. Langstein und ebenso auch durch unsere Durchblutungsversuche an der glykogenarmen Leber bewiesen wird, in d-Milchsäure über.

Dieser Vorgang kommt in unserem Schema durch die Pfeile zum Ausdruck, die vom Alanin zur Brenztraubensäure, von der Brenztraubensäure zur Milchsäure weisen.

Dies entspricht ganz der von O. Neubauer und seinen Mitarbeitern festgestellten Tatsache, daß der Abbau der α-Aminosäuren über α-Ketosäuren geht, und daß die beim Aminosäureabbau unter Umständen nachweisbaren α-Oxysäuren sekundäre Reduktionsprodukte der α-Ketosäuren sind.

Darauf, daß beim Kohlenhydratabbau das Verhältnis von Milchsäure und Brenztraubensäure das umgekehrte ist, daß

also hier Brenztraubensäure offenbar aus primär gebildeter Milchsäure entsteht, braucht kaum nochmals hingewiesen zu werden.

Äthylalkohol erweist sich bei der künstlichen Durchströmung der Leber als Acetessigsäurebildner. Daß der Weg vom Äthylalkohol zur Acetessigsäure über Acetaldehyd führt, erscheint wohl unzweifelhaft und kommt ebenfalls in einem entsprechenden Pfeil unseres Schemas zum Ausdruck.

Milchsäure bildet, wie aus früheren Versuchen von Embden und Salomon, sowie von Mandel und Lusk und aus den in jüngster Zeit von Parnas und Baer angestellten Versuchen hervorgeht, im tierischen Organismus Zucker.

Weswegen wir keinen Grund zu haben glauben, für diese Umwandlung einen anderen Hauptweg anzunehmen, als den unter direkter Umlagerung zum Glycerinaldehyd führenden, haben wir im Voranstehenden näher ausgeführt.

Wir möchten an dieser Stelle nochmals darauf hinweisen, daß für den Prozeß der Zuckerbildung aus Milchsäure — der allem Anschein nach in die Leber zu verlegen ist — nicht nur die unmittelbar durch Kohlenhydratabbau gebildete, sondern auch die durch Abspaltung aus dem Lactacidogen des Muskels entstandene Milchsäure in Betracht kommt.

Wir sehen also, daß für einen großen Teil der beim Kohlenhydratabbau sich abspielenden Vorgänge die Umkehrbarkeit direkt erweisbar ist.

Neben dem über Milchsäure führenden Kohlenhydratabbau kommen wohl sicher noch andere Arten des Abbaues in Betracht.

Namentlich weist, wie von früheren Autoren bereits hervorgehoben wurde, die Glucuronsäurebildung auf eine von vornherein mehr oxydative Verarbeitung des Kohlenhydratmoleküls hin. Voraussichtlich ist die früher von J. Wirth[1]) festgestellte Tatsache, daß d-Zuckersäure ein mächtiger Acetessigsäurebildner ist, namentlich im Zusammenhalt mit dem in einer voranstehenden Arbeit von Ohta erhobenen Befund, daß der d-Weinsäure sowie auch der Traubensäure die gleiche Eigen-

[1]) J. Wirth, Abbau von Kohlenhydratsäuren in der Leber. Diese Zeitschr. 33, 49, 1911.

schaft zukommt, für die nähere Kenntnis dieser Art des Kohlenhydratabbaues nicht ohne Bedeutung.

Vielleicht führt der Weg von der Zuckersäure zur Acetessigsäure über Weinsäure und Acetaldehyd.

Wenn aus unseren Versuchen mit großer Wahrscheinlichkeit hervorgeht, daß der zu d-Milchsäure führende Traubenzuckerabbau im Tierkörper im wesentlichen unter intermediärer Bildung von natürlichem Glycerinaldehyd erfolgt, während das Dioxyaceton hierbei höchstens eine untergeordnete Rolle spielen dürfte, so sind in früheren Untersuchungen, namentlich in denen von E. Buchner und Meisenheimer, wichtige Anhaltspunkte dafür gegeben, daß die im Hefepreßsaft erfolgende Bildung von Gärungsmilchsäure, sowie der für die Hefegärung charakteristische Kohlenhydratabbau unter Bildung von Alkohol und Kohlensäure in erster Linie ihren Weg über Dioxyaceton nehmen.

Die von uns ausgesprochene Vermutung, daß allgemein, d. h. in der gesamten organischen Welt, Dioxyaceton als Hauptquelle der Gärungsmilchsäure, optisch aktiver Glycerinaldehyd als Hauptquelle der d-Milchsäure in Betracht kommt, ist, wie wir hoffen, weiterer experimenteller Prüfung zugänglich.

Über die Verteilung des Blutzuckers auf Körperchen und Plasma.

Von

Rudolf Höber.

(Nach Versuchen von cand. med. Felix Sperling.)

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kiel.)

(Eingegangen am 28. Juli 1912.)

Im folgenden veröffentliche ich Versuche, die mein Schüler cand. med. Felix Sperling unter meiner Leitung ausgeführt hat; ein plötzlicher Tod hat ihn leider verhindert, über die von ihm mit großer Sorgfalt und Hingebung durchgeführten Untersuchungen selber zu berichten.

Durch die übereinstimmenden Untersuchungen von Lépine[1]), von Rona und Michaelis[2]), von Hollinger[3]), von E. Frank[4]) u. a. ist festgestellt, daß der Blutzucker sowohl im Blutplasma als auch in den Blutkörperchen enthalten ist, und daß der Zuckergehalt der Blutkörperchen, entgegen den früheren Angaben über das alleinige Vorkommen von Blutzucker im Plasma, meist ziemlich wenig von dem Zuckergehalt des Plasmas verschieden ist. Die durch diese Befunde nahegelegte Frage, ob die Blutkörperchen auch die Schwankungen im Zuckergehalt mitmachen, die beim Blut unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen vorkommen,

---

[1]) Lépine und Boulud, Compt. rend. de l'Acad. **1905**, S. 140.
[2]) Rona und Michaelis, diese Zeitschr. **16**, 60, 1909.
[3]) Hollinger, ebenda **17**, 1, 1909.
[4]) E. Frank, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 129, 1910.

ist dahin beantwortet, daß bei der diabetischen und febrilen Glykämie des Menschen, bei der alimentären Glykämie des Hundes, bei der Adrenalinglykämie des Kaninchens mit dem Zuckergehalt des Plasmas auch der der Blutkörperchen zu steigen pflegt. Durch all das scheint erwiesen, daß die Blutkörperchen für den Zucker durchlässig sind, d. h. daß kein Diffusionshindernis, etwa in Gestalt einer semipermeablen Plasmahaut, den Zucker am Eintritt in die Zelle hindert.

Dieser einfachsten Vorstellung vom Zustandekommen der beobachteten Zuckerverteilung stellen sich aber mehrere Bedenken entgegen. Rona und Döblin[1]) haben schon daran erinnert, daß zufolge den osmotischen Experimenten von Hamburger, Gryns, Hedin, Koeppe u. a. die Blutkörperchen sich gegen zuckerhaltige Lösungen verhalten, wie wenn sie für den Zucker impermeabel wären; sie schrumpfen in Lösungen, die durch Zucker hypertonisch gemacht sind, und bewahren ihre normale Form in isotonischen Zuckerlösungen. Dazu kommt, daß, wenn auch die analytisch nachgewiesene Zuckerverteilung meistens so statthat, als ob ein Diffusionsvorgang abläuft, doch auch Verteilungen vorkommen, die sich mit dieser einfachsten Vorstellung durchaus nicht zusammenreimen. So geben z. B. Rona und Döblin folgende Analysen von frischem, defibriniertem Blut des Menschen:

Zuckergehalt im Serum %	Zuckergehalt in den Blutkörperchen %
0,106	0,035
0,121	0,08
0,164	0,03
0,099	0
0,099	0
0,090	0
0,046	0,08

Bald enthalten also die Blutkörperchen verhältnismäßig große Mengen Zucker, bald sind sie vollkommen frei davon, obgleich das Serum, in dem sie schwimmen, zuckerhaltig ist,

[1]) Rona und Döblin, diese Zeitschr. 31, 215, 1911.

und gelegentlich ist der Zuckergehalt der Blutkörperchen höher als der des Serums, während gewöhnlich das umgekehrte Verhalten herrscht. Noch mehr zu denken geben folgende Beobachtungen: Rona und Döblin fügten zu dem defibrinierten menschlichen Blut Traubenzucker hinzu und untersuchten gleich darauf die Verteilung des Zuckers. Sie fanden u. a. folgende Steigerungen des Traubenzuckergehaltes im Serum und in den Blutkörperchen:

Fall 6:	Serum	0,121 % → 0,565 %	= 1 : 4,7
	Blutkörperchen	0,08 % → 0,32 %	= 1 : 4
Fall 10:	Serum	0,046 % → 0,352 %	= 1 : 7,7
	Blutkörperchen	0,08 % → 0,08 %	= 1 : 1
Fall 12:	Serum	0,164 % → 0,581 %	= 1 : 3,6
	Blutkörperchen	0,03 % → 0,15 %	= 1 : 5

Im Fall 6 ging also relativ wenig, im Fall 12 relativ viel Zucker in die Körperchen hinein, und im Fall 10 blieb aller Zucker im Serum und in die Blutkörperchen trat gar kein Zucker ein. Endlich erwähne ich noch die folgende Angabe von Rona und Takahashi[1]): Nach Claude Bernard nimmt durch Aderlaß der Blutzuckergehalt zu; während nun nach Rona und Takahashi diese Zunahme meistens sowohl das Plasma wie die Blutkörperchen betrifft, stieg in einem Versuch der Gehalt nur im Plasma und sank zu gleicher Zeit in den Blutkörperchen; es fanden sich folgende Werte:

	Plasma %	Blutkörp. %	Pl. : Bl.
	0,158	0,157	= 1,0 : 1
nach 45 Minuten	0,203	0,135	= 1,5 : 1
„ „ „	0,393	0,04	= 9,8 : 1

Es sieht also so aus, als schütteten die Körperchen den Zucker in das Plasma aus.

Alle diese und ähnliche Erfahrungen sind unter der bloßen Voraussetzung einer Verteilung des Zuckers im physikalischen Sinn nicht verständlich, sie legen vielmehr den Gedanken nahe,

[1]) Rona und Takahashi, diese Zeitschr. 30, 99, 1910.

daß die Blutkörperchen sich aktiv gegenüber dem Zucker verhalten, indem sie etwa von sich aus den Import bzw. Export regeln. Man wird freilich auch noch eine andere Art Aktivität in Betracht ziehen. Es ist vor allem daran zu denken, daß eine Nichtaufnahme durch eine ausgiebige Glykolyse im Innern der Körperchen vorgetäuscht sein könnte. Rona und Michaelis[1]) haben jedoch nachgewiesen, daß wenigstens bei Blut, das durch Fluornatrium ungerinnbar gemacht ist, aber oft auch bei defibriniertem Blut die Glykolyse keine nennenswerte Rolle spielt. Der zuletzt erwähnte Versuch von Rona und Takahashi bezieht sich aber auf Analysen von NaF-Blut; es sollte also, vorausgesetzt, daß, aus welchem Grunde auch immer, im Moment des Aderlasses das Plasma erheblich mehr Zucker enthält, als die Blutkörperchen, und daß die letzteren frei durchlässig für Zucker sind, noch im NaF-Blut ein Ausgleich zustande kommen. (Siehe hierzu auch S. 212.) Auch die übrigen der zitierten Angaben über die Verteilung des natürlich vorhandenen und des künstlich zugesetzten Zuckers bei defibriniertem menschlichen Blut sind wohl kaum durch die Annahme einer verschieden starken Glykolyse zu erklären; wie gesagt, wurden die Blutkörperchen sofort (1 bis 2 Minuten) nach dem Zuckerzusatz vom Serum getrennt und analysiert und ergaben dennoch, trotz starker Zuckeranreicherung im Serum, gelegentlich (Fall 10) keine Zunahme in den Körperchen; wir haben dem analoge Versuche mit gezuckertem Natriumoxalatblut an die Seite zu stellen, von denen später die Rede sein wird, bei denen der anfänglich in den Blutkörperchen vorhandene Zucker verschwand, während zu gleicher Zeit der Zuckergehalt des Plasmas zunahm. Endlich spricht wohl auch die Tatsache, daß die Doppelanalysen, die sowohl in unseren Versuchen wie in denen anderer Autoren ausgeführt wurden, gut unter sich übereinstimmten, gegen einen Anteil der Glykolyse an den genannten Ergebnissen. Denn zwischen der Verarbeitung der ersten und der zweiten Probe verstreicht wohl so gut wie immer eine Zeit von 5 bis 10 Minuten, die beim Vorhandensein einer starken glykolytischen Wirkung in den Analysendaten zum Ausdruck kommen müßte.

---

[1]) Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 18, 514, 1909.

Danach scheint es, als ob die wechselnde Verteilung des Zuckers auf Körperchen und Plasma auf eine wechselnde Durchlässigkeit der Körperchen bezogen werden muß, so daß also von einer unter allen Umständen vorhandenen freien Durchlässigkeit der Körperchen, bedingt durch ihre physikalische Beschaffenheit, nicht gut die Rede sein kann.

Wenn dies richtig ist, so wird man natürlich fragen, von was für Bedingungen die wechselnde Durchlässigheit abhängt. Darüber ist bisher nichts zu sagen. Um in dieser Hinsicht Erfahrungen zu sammeln, haben wir erneute Untersuchungen über die Verteilung des Blutzuckers vorgenommen und sind speziell der Frage nachgegangen, wie sich die Verteilung des Zuckers bei den verschiedenen Formen der experimentellen Glykämie gestaltet, zumal da zu Beginn unserer Untersuchungen allein die Verteilung bei alimentärer Glykämie analysiert war. Die Ergebnisse, die wir mitzuteilen haben, sind weit davon entfernt, etwas Abgeschlossenes zu bedeuten; sie können nur einen kleinen Beitrag zu den für das Verständnis der physiologischen Stoffverteilung notwendigen Kenntnissen liefern, zu deren Sammlung die gemeinsame Arbeit vieler erforderlich ist.

Versuche.

Unsere Versuche beschränken sich auf Analysen des Blutes von Hunden und Kaninchen. Das Blut wurde den gefesselten Tieren durch eine eingebundene Kanüle entnommen, den Hunden aus der V. jugularis, der V. femoralis oder der Carotis, den Kaninchen aus der Carotis. Die Hunde wurden in der Mehrzahl mit Morphium + Äther narkotisiert.

Wie es auch die früheren Untersucher meist gemacht haben, wurden die Analysen am Gesamtblut und am Plasma ausgeführt und der Zuckergehalt der Körperchen dann durch Rechnung gefunden. Zur Analyse des Gesamtblutes wurde das Blut in dem Zehntelvolumen einer 3%igen NaF-Lösung aufgefangen. Für die Analyse des Plasmas ist dieselbe Art, die Gerinnung zu verhindern, nicht anzuwenden, da die 3%ige NaF-Lösung stark hypertonisch ist, das Plasma also durch Auspressen der Blutkörperchen verdünnt wird. Von einer mit dem Blut isotonischen, d. h. ca. 0,73%igen NaF-Lösung müßte

man aber dem Blut zu viel zusetzen, um seine Gerinnung zu verhindern, da ungefähr 0,3 g NaF auf 100 g Blut zur Gerinnungshemmung notwendig sind. Darum verwendeten wir zur Plasmagewinnung Natriumoxalat. Davon genügen zur Verhinderung der Gerinnung ca. 0,1%, und da eine ungefähr 1,5%ige Lösung mit dem Blut isotonisch ist, so ist ein Zusatz von einem Zehntelvolumen einer 1,5%igen Lösung zum Blut mehr als ausreichend. Welchen Einfluß die genannten Lösungen auf das Blutkörperchen- bzw. Plasmavolumen ausüben, geht aus folgendem Protokoll eines Hämatokritversuches hervor, in welchem die Blutkörperchen-Volumina, die nach verschieden langem Zentrifugieren abgelesen wurden, verzeichnet sind:

Mischung von 27 ccm Blut + 3 ccm Lösung:

	1% NaCl	1,5% NaOxal.
Vol. nach 10 Min.	61,5	59
„ 23 „	54,5	53
„ 33 „	52	51
„ 38 „	52	51

	1% NaCl	3% NaF
Vol. nach 10 Min.	61	51
„ 21 „	53,5	46,5
„ 33 „	51	44
„ 39 „	51	44

Zur analytischen Methodik ist wenig hinzuzufügen; wir hielten uns an die erprobten Verfahren. Die Enteiweißung erfolgte nach der von Michaelis und Rona[1]) eingeführten Methode der Fällung mit kolloidem Eisenhydroxyd, die Zuckerbestimmung in den durch Vakuumdestillation eingeengten Flüssigkeiten anfangs sowohl durch Polarisation als auch durch Titration nach Bertrand[2]), später zur Ersparnis von Blut allein durch die Titration[3]). Fast in allen Versuchen wurden, wie schon gesagt wurde, Doppelanalysen ausgeführt.

Wir gelangten so zu folgenden Ergebnissen:

[1]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 2, 5 und 7.

[2]) Bertrand, Bull. de la Société chimique 35, 1285, 1906.

[3]) Nach Takahashi (diese Zeitschr. 37, 30, 1911) ergeben die Polarisation und die Titration nach Bertrand fast übereinstimmende Werte.

I. Versuche an „normalen“ Hunden.

Versuchs-Nr.		Blutkörp.-Volumen	Zucker in			Plasma-Zucker : Blutkörperchen-Zucker
			Blut %	Plasma %	Blutkörperchen %	
7	Minka . . 18 kg	49,4	0,099	0,122	0,075	1,6
8	Ella . . . 20,5 „	46,1	0,086	0,099	0,070	1,4
9	Jagdhund . 13 „	49,7	0,083	0,119	0,047	2,5
10	Minka . . 18 „	43,2	0,094	0,114	0,067	1,7
11	Mohr . . . 16 „	47,9	0,089	0,125	0,049	2,5
18	Molly . . . 13 „	53,7	0,094	0,134	0,060	2,2
19	Zampa . . 18,5 „	46,7	0,220	0,345	0,077	2,8
23	Bobbi . . —	47,7	0,098	0,112	0,083	1,35
25	Bello . . . 20 „	32,5	0,135	0,1375	0,131	1,05
34	Finis . . . 8 „	49,8	0,2495	0,374	0,124	3,0

Der Zuckergehalt des Plasmas ist also bei unseren normalen Hunden durchweg höher, der berechnete Zuckergehalt der Blutkörperchen durchweg geringer als der des Gesamtblutes. Die Blutzucker- und die Plasmazuckerwerte in Versuch 19 und 34 überragen die übrigen bei weitem und sind so groß, wie wir sie sonst nur bei experimentellen Glykämien fanden. Einen Grund dafür können wir nicht angeben. Auch das Verhältnis der Zuckergehalte von Plasma und Blutkörperchen ist bei diesen 2 Versuchen größer als bei den anderen. Lassen wir diese 2 Versuche beiseite, so bekommen wir als Mittelwert aus den übrigen 8 Versuchen:

Blut 0,097%, Plasma 0,120%, Blutkörperchen 0,073%,
Plasma : Blutkörperchen 1,64.

Aus einer ebenfalls an Hunden durchgeführten Versuchsserie von **Rona** und **Michaelis** ergeben sich als Mittelwerte ihrer 8 Versuche:

Blut 0,162%, Plasma 0,179%, Blutkörperchen 0,107%,
Plasma : Blutkörperchen 1,67.

Die Zuckerwerte sind also sämtlich höher als unsere; der Wert Plasma : Blutkörperchen stimmt mit dem unsrigen überein.

II. Hunde mit Adrenalinglykämie.

Wir verwendeten die 0,1%ige Adrenalinlösung von Parke, Davis & Co. und injizierten langsam 3 bis 8 mg, meist in eine Vene oder in die Bauchhöhle, einmal auch subcutan. Die

Blutentnahme wurde gewöhnlich 20 bis 80 Minuten nach der Injektion vorgenommen. Wir fanden folgendes:

Versuchs-Nr.		Adrenalin-Dosierung	Blutentnahme	Blutkörp.-Volumen	Zucker in			Plasma-Zucker : Blutkörperchen-Zucker
					Blut %	Plasma %	Blutkörp. %	
4	Ella . . . . 20 kg	8 mg subcutan	nach 105′	55,0	0,119	0,191	0,061	3,1
5	Schäferhund 13,5 „	3 mg intraven., 3 mg intraperit.	„ 20′	47,2	0,191	0,276	0,095	2,9
6	„ 13,5 „	6,5 mg intraven.	„ 35′	41,7	0,220	0,360	0,025	14,4
12	Ella . . . . 20,5 „	2 mg intraperit., 5,5 mg intraven.	„ 45′	40,6	0,195	0,261	0,0985	2,6
13	Minka . . . 18 „	2 mg intraperit., 5 mg intraven.	„ 30′	40,0	0,240	0,328	0,1075	3,1
15	Mohr . . . 16 „	2,5 mg intraven., 3,5 mg intraperit.	a) „ 35′ b) „ 75′	38,9 38,3	0,237 0,278	0,339 0,413	0,078 0,059	4,4 7,1
21	Zampa . . 18,5 „	7 mg intraven.	„ 80′	26,5	0,318	0,406	0,073	5,6
30	Bobbi . . . —	7 mg intraven.	a) „ 70′ b) „ 130′	45,6 46,7	0,139 0,133	0,293 0,251	0 0	∞ ∞

Wir finden also beim Blut und beim Plasma im Verhältnis zu den Normalversuchen im allgemeinen eine Steigerung des Zuckergehaltes, die Werte für die Blutkörperchen verhalten sich unregelmäßig. Die Berechnung der Mittelwerte

Blut 0,207%, Plasma 0,312%, Blutkörperchen 0,060%

lehrt, daß der mittlere Gehalt der Blutkörperchen bei der Adrenalinglykämie sogar etwas geringer ist als in den Normalversuchen.

Wie ein Vergleich der Tabellen für die Normaltiere und für die Adrenalintiere zeigt, wurde mehrfach ein und dasselbe Tier bei normalem Verhalten und unter Adrenalinwirkung untersucht. Stellen wir die am gleichen Tier gewonnenen Werte zusammen, so erhalten wir folgendes:

			Zucker			Plasma-Zucker: Blutkörperchen-Zucker
			Blut %	Plasma %	Blutkörperchen %	
Hund Ella:	16. I.	normal	0,086	0,099	0,070	1,4
	14. XII.	Adrenalin	0,119	0,191	0,061	3,1
	29. I	„	0,195	0,261	0,0985	2,6
Hund Mohr:	26. I.	normal	0,089	0,125	0,049	2,5
	12. II.	Adrenalin	a. 0,237	0,339	0,078 ↓	4,4
	12. II. 40′ später	„	b. 0,278	0,413 ↓	0,059 ↑	7,1
Schäferhund:	18. XII.	Adrenalin	0,191	0,276	0,095 ↑	2,9
	8. I.	„	0,220	0,360 ↓	0,025	14,4
Hund Minka:	13. I.	normal	0,099	0,122	0,075	1,6
	23. I.	„	0,094	0,114	0,067	1,7
	3. II.	Adrenalin	0,240	0,328	0,1075	3,1
Hund Zampa:	28. II.	normal?	0,220	0,345	0,077	2,8
	4. III.	Adrenalin	0,318	0,406	0,073	5,6

Die Zusammenstellung lehrt, daß der Zuckergehalt des Plasmas und der Blutkörperchen bei einem Tier Schwankungen erfahren kann, die weitgehend unabhängig voneinander verlaufen. Man könnte versucht sein, hier abermals, wie bei den vorausgegangenen Erörterungen, verschiedene Ursachen zur Erklärung heranzuziehen; wenn, wie z. B. in dem Versuch an „Schäferhund“, der Zuckergehalt des Plasmas erheblich steigt und der Zuckergehalt der Blutkörperchen in der gleichen Zeit stark sinkt, so könnte man das ebensowohl dahin deuten wollen, daß die Blutkörperchen nicht nur nichts von dem vermehrten Blutzucker aufnehmen, sondern sogar Zucker ins Plasma abschieben, als auch dahin, daß in der Zeit zwischen dem 18. XII. und dem 8. I. die glykolytischen Fähigkeiten der Blutkörperchen zugenommen haben. Aber den zweiten Deutungsversuch, die wechselnde Verteilung allein auf den Chemismus der Blutkörperchen zurückzuführen und jede besondere Import- und Exportfähigkeit der Blutkörperchen außer Berechnung zu lassen, wird man hier wiederum zurückstellen, sobald man bedenkt, daß mindestens nachträglich in dem aus dem Tier zur Analyse entnommenen und ungerinnbar gemachten Blut die vorhandenen großen Unterschiede in der Zuckerkonzentration bei Plasma und Blutkörperchen sich einigermaßen ausgleichen müßten, wenn die Blutkörperchen unter allen Umständen durch-

lässig für die Zellen wären. Vollends Analysen, wie diejenige des Versuchs 30 (Hund Bobbi), sprechen gegen eine rein physikalisch bedingte Permeabilität der Blutkörperchen für den Zucker.

Um diesen Schlußfolgerungen noch eine Stütze zu geben, haben wir Versuche folgender Art ausgeführt: Wir haben normalen Tieren Blut entzogen, es mit Natriumoxalat ungerinnbar gemacht und dann Zucker zugesetzt. Dann haben wir eine Probe dieses künstlich glykämischen Blutes sofort analysiert, eine zweite Probe erst nach 25 bis 40 Minuten. Würde starke Glykämie in Betracht kommen, so müßte es sich an der Differenz der Zuckergehalte in Gesamtblut 1 und 2 zeigen. Vor allem aber müßten, falls die Glykolyse keine Rolle spielt, etwaige Unterschiede in der Zuckerkonzentration, die in der ersten Probe gefunden wurden, in der zweiten kleiner geworden sein, wofern die Blutkörperchen für den Zucker permeabel sind. Denn der extrem kurze Diffusionsweg von der Blutkörperchenoberfläche in das Blutkörpercheninnere müßte bei freier Diffusibilität in der Zeit von 25 bis 40 Minuten zurückgelegt werden. Die Versuche ergaben folgende Resultate:

Versuchs-Nr.		Blutkörp.-Volumen	Zucker in			Plasma-Zucker: Blutkörperchen-Zucker
			Blut %	Plasma %	Blutkörperchen %	
31	Hundeblut	37,8	0,398	0,572	0,106	5,4
	„ nach 30′		0,398	0,576	0,099	5,8
32	Kaninchenblut	23,9	0,585	0,652	0,372	1,75
	„ nach 38′		0,532	0,712	0	∞
33	Kaninchenblut	29,9	0,556	0,741	0,122	6,05
	„ nach 25′		0,541	0,786	0	∞
34	Hundeblut	49,8	0,435	0,793	0,074	10,7
	„ nach 39′		0,454	0,793	0,112	7,1

In Versuch 31 ändert sich also in den 30 Minuten so gut wie nichts, der hohe Konzentrationsunterschied zwischen Plasma und Blutkörperchen bleibt bestehen; in Versuch 32 und 33 an Kaninchenblut verringert sich der anfängliche Konzentrationsunterschied nicht nur nicht, sondern er wird sogar noch größer, indem die Blutkörperchen offenbar ihren Zucker ins Plasma hinausschütten, und in Versuch 34 bleibt auch wieder inner-

halb 39 Minuten ein sehr großer Konzentrationsunterschied erhalten.

Werfen wir hiernach nun noch einen Blick auf die letzte Zahlenkolonne Plasma-Zucker : Blutkörperchen-Zucker in der Tabelle der Versuche über Adrenalinglykämie (S. 216). Auch wenn wir die beiden letzten Werte außer acht lassen, finden wir beim Vergleich mit den entsprechenden Werten der Normalversuche höhere Zahlen; der Mittelwert der freilich sehr stark schwankenden Zahlen ist, ohne die letzten zwei Versuche, 5,4 an Stelle von 1,64 in den Normalversuchen. Diese Zahl bedeutet nichts weiter, als eine Wiederholung der bereits (S. 215) hervorgehobenen Tatsache,. daß bei der Adrenalinglykämie in unseren Versuchen am Hund die Zuckeranreicherung stark das Plasma und nicht immer die Blutkörperchen betrifft. Entsprechend den aus den Analysen bisher gezogenen Schlüssen läßt sich das so deuten, daß bei der Adrenalinglykämie die Blutkörperchen sich relativ fest gegen den Plasmazucker verschließen.

III. Hunde mit alimentärer Glykämie und mit Glykämie nach Pankreasexstirpation.

Über solche Tiere können wir wegen der kleinen Zahl der bisher ausgeführten Versuche nur wenig sagen. Wir fanden:

Versuchs-Nr.			Blut-körp.-Volumen	Zucker in Blut %	Zucker in Plasma %	Zucker in Blutkörperchen %	Plasma-Zucker : Blutkörperchen-Zucker
18	Molly 13kg	23. II. normal	53,7	0,094	0,134	0,060	2,2
22	„	6. III. 3 1/2 Std. nach 170g Traubenzuck. in Milch	46,7	0,243	0,366	0,103	3,6
11	Mohr 16kg	26. I. normal	47,9	0,089	0,125	0,049	2,5
20	„	29. II. 3 1/2 Std. nach 150g Traubenzuck.	41,25	0,151	0,204	0,074	2,8
14	Flock	Nach Pankreasexstirpation[1])	56,4	0,379	0,621	0,192	3,23

[1]) Wir verdanken das pankreasexstirpierte Tier Herrn Privatdozenten Dr. Michaud.

Es zeigt sich also, daß, ebenso wie bei den Adrenalintieren, die Zunahme des Zuckergehaltes das Plasma relativ mehr betrifft als die Blutkörperchen.

IV. Kaninchen mit Adrenalinglykämie.

Während unsere Untersuchungen im Gange waren, erschien eine Arbeit von E. Frank und Bretschneider[1]), in der sie Mitteilungen über die Verteilung des Zuckers im Blut von normalen und von adrenalinglykämischen Kaninchen machen. Leider ist die Blutmenge bei Kaninchen im allgemeinen zu klein, als daß sich an einem und demselben Tier mehrere Versuche machen ließen; daher sind in den Versuchen von Frank und Bretschneider ebensowenig wie in unseren Versuchen die Adrenalinwerte direkt mit Normalwerten zu vergleichen. Frank und Bretschneider fanden ähnlich, wie das auch bei anderen Bluten gefunden ist, daß in der Norm der Zuckergehalt der Blutkörperchen meist geringer als der des Plasmas, manchmal sogar gleich Null ist, daß er aber gelegentlich auch den Gehalt des Plasmas übertrifft. Als Mittelwert ergibt sich aus den acht Versuchen von Frank und Bretschneider für das Verhältnis von Plasma-Zucker : Blutkörperchen-Zucker 0,152 : 0,095 = 1,6. Bei ihren vier Adrenalinversuchen ist dieser Quotient viel größer, sie fanden:

Blutkörperchen-Volumen	Zucker in			Plasma-Zucker : Blutkörperchen-Zucker
	Blut %	Plasma %	Blutkörperchen %	
32,5	0,438	0,616	0,07	8,8
28,2	—	0,638	0,121	5,3
30,75	0,544	0,702	0,182	3,9
35,0	0,594	0,772	0,262	2,9

Es ist ersichtlich, daß, worauf Frank und Bretschneider auch aufmerksam machen, die Steigerung des Blutzuckergehaltes wesentlich das Plasma betrifft. Die Mittelwerte sind:

Blut 0,525%, Plasma 0,682%, Blutkörperchen 0,156%,

Plasma : Blutkörperchen 4,4.

---

[1]) E. Frank und Bretschneider, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 225, 1912.

Unsere eigenen Befunde an Adrenalinblut sind ähnliche:

Versuchs-Nr.		Adrenalin-Dosierung	Blutentnahme	Blutkörp.-Volumen	Zucker in Blut %	Zucker in Plasma %	Zucker in Blutkörp. %	Plasma-Zucker : Blutkörperch.-Zucker
16	Kaninchen 3000 g	2 mg subcutan	nach 55′	30,0	0,426	0,629	0	∞
24	Kaninchen 3000 g	2 mg subcutan	„ 90′	27,8	0,336	0,485	0	∞
26	Kaninchen 3000 g	2 mg subcutan	„ 80′	45,8	0,364	0,569	0,121	4,7
28	Kaninchen 2700 g	2 mg subcutan	„ 75′	36,2	0,374	0,572	0,026	22,25

Also auch in unseren Versuchen steigt in der Adrenalinglykämie hauptsächlich der Plasmazucker an.

V. Kaninchen mit alimentärer Glykämie.

Endlich haben wir noch einige wenige Versuche über die Zuckerverteilung bei alimentärer Glykämie der Kaninchen ausgeführt. Ihre Resultate sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Versuchs-Nr.		Zuckerzufuhr	Blutentnahme	Blutkörp. Volumen	Zucker in Blut- %	Zucker in Plasma %	Zucker in Blutkörp. %	Plasma-Zucker : Blutkörperch.-Zucher
17	Kaninchen 3750 g	40 g Traubenzucker + 90 Wasser in den Magen	nach 3 Std.	30,7	0,248	0,344	0,03	11,1
27	Kaninchen 3000 g	20 g Traubenzucker + 40 Wasser in den Magen	nach 3 Std.	23,6	0,847	1,017	0,293	3,5
29	Kaninchen 3000 g	20 g Traubenzucker + 40 Wasser in den Magen	nach 3 Std.	37,7	0,227	0,214	0,249	0,86

Die Wirkungen der Zuckerzufuhr sind also diesmal recht ungleichmäßige. Beachtenswert ist, daß in Versuch 29 der Zuckergehalt der Blutkörperchen den des Plasmas übersteigt.

Schluß.

Blicken wir nun noch einmal auf die Gesamtheit der mitgeteilten Versuche zurück, so prägt sich als Haupteindruck der ein, daß bei den beobachteten Änderungen des Gesamtblutzuckergehaltes von parallelen Schwankungen des Plasmazuckers und des Blutkörperchenzuckers keine Rede sein kann. Derartige Parallelschwankungen hätte man aber zu erwarten, wenn die Blutkörperchen im physikalischen Sinne durchlässig für den Zucker wären, vorausgesetzt, daß Komplikationen durch chemische Angriffe auf den Zucker im Inneren der Blutkörperchen nicht in Frage kommen. Nach unseren Erörterungen und Erfahrungen können die letzteren aber in der Tat nicht zur Erklärung der Schwankungen herangezogen werden. Wir müssen daher schließen, daß die Blutkörperchen ihren Zuckergehalt von sich aus regeln, indem sie aktiv den Import bzw. Export besorgen. Diese Regulierfähigkeit wirkt nach unseren Versuchen wie nach denjenigen von Frank und Bretschneider in dem speziellen Falle der Adrenalinglykämie dahin, daß der Zuckerüberschuß vornehmlich im Plasma bleibt. Soweit unsere wenigen Erfahrungen bisher reichen, trifft dasselbe für die Verhältnisse bei der alimentären Glykämie und bei der Glykämie nach der Pankreasexstirpation zu.

Über Heroinausscheidung und -gewöhnung.

Von

Hans Langer.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 27. Juli 1912.)

Das von Dreser unter dem Namen „Heroin“ in die Therapie eingeführte Diacetylmorphin ist in zahlreichen Untersuchungen auf seine Wirkung auf die Atmung geprüft worden. Es fehlen aber bisher Untersuchungen über seinen Verbleib im Tierkörper sowie experimentelle Gewöhnungsversuche, obgleich diese Punkte in einer Gegenüberstellung zu den Resultaten, die bei dem ihm verwandten Morphin und Codein gewonnen wurden, großes Interesse beanspruchen dürfte.

I. Ausscheidung.

Bei seiner Untersuchung der Morphinausscheidung konnte Tauber[1]) feststellen, daß das auf subcutanem Wege einverleibte Morphin durch die Magenschleimhaut eliminiert, von hier aus in den Darm befördert und mit den Faeces ausgeschieden wird. In quantitativ genauen Versuchen gelang es ihm, im Kot 41,3% der subcutan injizierten Menge wiederzufinden.

In einer zweiten Arbeit fand dann Tauber[2]), daß das Methylderivat des Morphins, das Codein, quantitativ im Harn ausgeschieden wird. Es genügt also die Methylierung der Phenolhydroxylgruppe des Morphins, um die Exkretionsbedingungen vollständig zu ändern. Dieses Verhalten ist wohl durch die infolge des Eintrittes der Methylgruppe geänderten physikalischen Eigenschaften bedingt. Denn in letzteren unterscheidet sich das Codein wesentlich vom Morphin. Während z. B. Codein in Wasser, Äther und Benzol löslich ist, löst sich Morphin in diesen Flüssigkeiten nur unvollkommen.

In seinen physikalischen Eigenschaften steht dem Codein das Diacetylmorphin oder „Heroin“ sehr nahe; es löst sich zwar in Wasser

---

[1]) Tauber, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 27.

[2]) Tauber, Inaug.-Diss. Straßburg 1892.

kaum, in Äther nur schwer, hingegen sehr leicht in Chloroform und Benzol. Bei dem Heroin sind beide Hydroxylgruppen besetzt, doch sind die Bindungen der Substituenten viel lockerer als beim Codein; schon beim Erhitzen einer wässerigen Lösung wird die eine Acetylgruppe abgespalten und es entsteht α-Monoacetylmorphin [Danckworth[1])]; beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure und Zusatz von Äthylalkohol beweist der auftretende Essigäthergeruch ebenfalls eine Abspaltung von Acetylgruppen.

Die Frage, ob nun das Heroin im Tierkörper wie Morphin durch den Darmtraktus oder wie Codein im Harn ausgeschieden wird, soll im folgenden beantwortet werden.

Methodik.

Bei der Prüfung einer Ausscheidung im Harn konnte ich mich zum qualitativen Nachweis der allgemeinen Alkaloidreaktionen bedienen, da ja das Heroin bei den Versuchen das einzige zugeführte Alkaloid war; diese Reaktionen haben vor den spezifischen Heroinreaktionen den Vorteil, daß sie in Lösungen angestellt werden können, wesentlich empfindlicher sind und schließlich auch Spaltungsprodukte des Heroins anzeigen.

Benutzt wurde die Reaktion mit Jodjodkaliumlösung (Wagnersches Reagens), dessen Empfindlichkeitsgrenze für Heroin bei Verdünnungen von 1:100000 liegt.

Die Identifizierung des ausgeschiedenen Alkaloids erfordert aber eine Methode zur Isolierung.

Bei Berücksichtigung der Eigenschaften des Heroins ergaben sich hier Schwierigkeiten, die ein quantitatives Arbeiten als völlig unmöglich erscheinen lassen. Heroin ist zwar in Chloroform und Benzol leicht löslich, doch läßt es sich, wie zahlreiche Versuche mit Harnmengen, denen Heroin zugesetzt war, zeigten, niemals völlig aus Harn ausschütteln. Zudem sind große Harnmengen, wie sie sich bei Versuchen an Hunden ergeben, nur sehr unbequem durch Ausschütteln zu verarbeiten, während die Versuche an Kaninchen wegen der durch Heroin stark herabgesetzten Diurese scheiterten. Die Harnmengen einzudampfen und den Rückstand zu verarbeiten ging deswegen nicht an, weil das Heroin beim Erhitzen auf 70° bereits

---

[1]) Danckworth, Arch. f. Pharm. 228, 572.

zersetzt wird. Das Einengen im Vakuum war wegen der großen Mengen ebenfalls unmöglich. Es erfordert sehr viel Zeit und läßt dann wieder eine Zersetzung des Heroins befürchten. Ich habe daher auf die quantitative Gewinnung verzichtet und bin zur Isolierung des Alkaloids folgendermaßen vorgegangen:

Der Harn wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit Benzol viermal ausgeschüttelt (Chloroform gibt zu leicht Emulsionen). Die vereinigten Benzolauszüge wurden filtriert und das Benzol auf dem Wasserbade abdestilliert. Daß das Erhitzen der Benzollösung dem Heroin nichts schadet, bewies eine Probe, bei der Heroin dem Benzol zugesetzt war; nach mehrstündigem Erhitzen auf Siedetemperatur ergab der Rückstand einen Schmelzpunkt von 168° (Schmelzpunkt des Heroins 168 bis 173° nach verschiedenen Angaben).

Dieser Erfahrung entsprechend habe ich dann die Ausschüttelung durch 6stündige Extraktion im Kutscher-Steudelschen Extraktionsapparat ersetzt. Die Rückstände der Benzoldestillation, die noch stark gefärbt waren, wurden gesammelt und zur Reinigung in salzsäurehaltigem Wasser gelöst; die Lösung wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit Chloroform ausgeschüttelt (Heroin krystallisiert aus Chloroform schöner als aus Benzol). Die nach dem Verdunsten des Chloroforms sich ergebenden Krystalle waren aber immer noch etwas gelb gefärbt. Da nach dem Umkrystallisieren ein beträchtlicher Teil verloren geht, so wurde es nicht wiederholt.

Bei der Identifizierung der gewonnenen Krystalle kamen in Betracht: Morphin, Monoacetylmorphin und Diacetylmorphin, deren Unterscheidung nach umstehender Reaktionstabelle möglich ist.

Bei der Prüfung der Ausscheidung in dem Kot ließ sich aber die Schonung des Alkaloids nicht durchführen; hier wurde infolgedessen nur auf den allgemeinen qualitativen Nachweis eines Morphinderivates Wert gelegt. Zur Isolierung wurde folgendermaßen vorgegangen:

Der Kot wurde getrocknet und zerrieben, dann 12 Stunden mit Alkohol am Rückflußkühler erhitzt. Der alkoholische Auszug wurde abfiltriert, das Filtrat eingedampft; der Rückstand in salzsäurehaltigem Wasser aufgenommen, filtriert, ammo-

Reaktionstabelle.

Reagens	Morphin	Monoacetylmorphin	Diacetylmorphin
Fröhde	Violett, dann über Bläulich in schmutzig Grün, schließlich schwach rot	Violett (schnell verschwindend) bläulich, dann gelb	Kirschrot, geht durch schmutzig Rot in Gelb über
Eisenchlorid	Blaufärbung	Keine Färbung	Keine Färbung
Konzentrierte Salpetersäure	Blutrot, allmählich in Gelb übergehend	Blutrot, allmählich in Gelb übergehend	Löst sich mit gelber Farbe, die allmählich in Grünblau übergeht
Verdünnte Schwefelsäure + Äthylalkohol	—	?	Geruch nach Essigester
Jodsäure	Wird reduziert	Wird reduziert	Wird nicht reduziert
Schmelzpunkt	230°	187°	170°

niakalisch gemacht und 24 Stunden mit Benzol im Extraktionsapparat extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Benzols bleibt ein geringer Rückstand zur Prüfung zurück.

Versuche.

Nach subcutaner Injektion von Lösungen von Heroinum hydrochloricum[1]) bei Kaninchen und bei Hunden beweist der positive Ausfall der Alkaloidreaktion, daß Alkaloid im Harn ausgeschieden wird. Wenn man berücksichtigt, daß die Harnmenge, die den positiven Ausfall zeigte (beim Hunde), ca. 2 l betrug, so konnte, da die Empfindlichkeitsgrenze der Jodjodkaliumreaktion auf Heroin bei 1:100000 liegt, hieraus bereits auf eine überwiegende Ausscheidung durch die Nieren geschlossen werden. Denn in 2 ccm (so viel diente zur Reaktion) müssen wenigstens 0,00002 g, d. h. in 2 l 0,04 g Alkaloid enthalten sein (bei einer Injektionsmenge von 0,12 g Her. hydrochl.).

Ich habe nun auf dem angegebenen Wege nach zahlreichen Injektionen eine zur Prüfung genügende Menge Rückstand erhalten, dessen Untersuchung folgendes ergab:

[1]) Die zur Untersuchung benötigten Mengen von Heroinum hydrochloricum waren in entgegenkommendster Weise von den Elberfelder Farbwerken zur Verfügung gestellt worden.

Fröhde: Erst kirschrot, allmählich gelb werdend.

Eisenchlorid: Keine Färbung.

Konz. Salpetersäure: Löst sich mit gelber Farbe, die in Grünblau übergeht.

Essigester: Positiv.

Jodsäure: Keine Reduktion.

Schmelzpunkt: 175°.

Hieraus läßt sich schließen, daß der Rückstand in der Harnmenge aus Heroin besteht; die Erhöhung des Schmelzpunktes legt allerdings die Möglichkeit nahe, daß eine Verunreinigung mit Monoacetylmorphin vorliegt. Immerhin geht hervor, daß von dem auf subcutanem Wege beigebrachten Heroin ein beträchtlicher Teil unverändert im Harn ausgeschieden wird. Die Untersuchung des Kotes ergab einen Rückstand, der eine schwache positive Reaktion mit Marquisschem Reagens zeigte; hiernach wird also ein geringer Teil des Heroins möglicherweise im verseiften Zustande nach dem Darm hin abgeschieden.

Es wird also Heroin zum größten Teil durch die Nieren wie Codein, zum kleineren Teil durch den Darm wie Morphin abgeschieden, und es scheint hiernach, als ob die Ausscheidungswege der Morphinderivate abhängig sind von der Anwesenheit der freien Hydroxylgruppen.

Schließlich habe ich die Ausscheidung des Heroins im Verlauf von später anzuführenden Gewöhnungsversuchen geprüft. So habe ich bei einem Hunde nach 2monatiger Gewöhnung nach den angegebenen Methoden weder im Harn noch im Kot Alkaloid nachweisen können.

II. Gewöhnung.

Die Analogie zwischen Codein und Heroin in der Ausscheidung legt nun die Frage nahe, ob das physiologische Verhalten beiden Alkaloiden gegenüber ebenfalls Übereinstimmung zeigt, in erster Linie, ob bei fortgesetzten Gaben an Heroin Gewöhnung eintritt oder nicht. Auch bei dieser Frage zeigt sich zwischen Morphin und Codein trotz der nahen chemischen Verwandtschaft ein fundamentaler Unterschied. Im Gegensatz zur Morphingewöhnung fand Bouma[1]), daß bei fortgesetzter

[1]) Bouma, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 50.

Darreichung des Codeins keine Gewöhnung, sondern eher eine Überempfindlichkeit festzustellen ist.

Für das Heroin liegen nun zahlreiche klinische Erfahrungen vor, die für einen sich bei längerer Zeit fortgesetzter Darreichung entwickelnden Heroinismus zu sprechen scheinen. So berichten Manguat und Blondel[1]) über solche Fälle, Comar und Buvat[2]) beschreiben einen Fall, in dem schließlich 2,8 g pro die genommen wurden.

Um nun der Frage der Gewöhnung an Heroin experimentell nähertreten zu können, war es zunächst erforderlich, die Erscheinungen der akuten Vergiftung bei verschieden hohen toxischen Dosen zu studieren. Denn nur die ausführliche Kenntnis des Verlaufes der akuten Vergiftung kann die Modifikation bei Gewöhnungsversuchen klar dartun.

Versuche zur toxischen Wirkung des Heroins.

Es ist bekannt, daß die toxische Wirkung des Heroins von seiner Krampfwirkung abhängt. Auch in den klinischen Vergiftungsbildern steht diese im Vordergrund. So berichtet Carbonell y Soles[3]) von einem Fall, in dem nach 0,167 g ein hochgradiger Schwächezustand mit Krämpfen in den Extremitäten eintrat. Welche Rolle eine von Dreser[4]) als primäre Todesursache bezeichnete Atemlähmung spielt, darüber wird später zu reden sein.

Meine Versuche beziehen sich auf Hunde und Kaninchen. Das Heroin wurde in 5 bis 10%iger Lösung von Heroinum hydrochloricum subcutan injiziert. Lokale Erscheinungen nach der Injektion wurden niemals beobachtet. Wurde — was gelegentlich vorkommt — versehentlich eine Vene getroffen, so kam es bei Hunden unmittelbar nach der Injektion zu heftigen Schmerzäußerungen, die Tiere liefen wild umher, fielen dann chokartig zu Boden und bekamen in verschiedenem Grade Zuckungen, doch trat immer schnell Erholung ein. Diese Chokwirkung ist auch klinisch bei Morphininjektionen beobachtet worden.

---

[1]) Manguat und Blondel, Münch. med. Wochenschr. 1903, 1709.
[2]) Comar und Buvat, Presse méd. 1904, Nr. 54.
[3]) Zitiert nach Kobert, Lehrb. d. Toxikologie. S. 999.
[4]) Dreser, Therap. Monatsh. 1898, 509.

Der Verlauf der Heroinvergiftung beim Kaninchen zeigt sich in folgender Weise: Zunächst strecken sich bei dauernder Bauchlage langsam die hinteren Extremitäten nach hinten aus, dann die vorderen nach vorn, so daß das ganze Tier gewaltsam gestreckt erscheint, dabei ist der Kopf mehr oder weniger zurückgezogen. Es beginnen fibrilläre Zuckungen, dann werden die Extremitäten in kurzen Abständen immer wieder stoßweise gestreckt. Dies ist der Übergang zu den jetzt einsetzenden klonischen Krämpfen. Während dessen hat sich die Atmung außerordentlich verlangsamt. Das Tier fällt auf die Seite. Die klonischen Krämpfe gehen in Tetanus über, maximale Atemnot, das Tier stößt leichte Schreie aus, schließlich erfolgt der Tod durch Atemstillstand im Tetanus. Bei den letalen Dosen macht sich im Anfang eine auffällige Ruhe geltend, die vielleicht der Ausdruck von schnell eintretenden zentralen Lähmungen ist. (Das Vergiftungsbild erinnert lebhaft an die von Schroeder[1]) beschriebenen Symptome der Codeinvergiftung.)

Die Schilderung dieses Vergiftungsverlaufs bezieht sich natürlich auf letale Dosen. Zur Veranschaulichung der Wirkung verschieden hoher toxischer Dosen wähle ich aus einer Reihe von 13 Versuchen folgende Beispiele aus:

Versuch 1.

Kaninchen, 1800 g. Dosis: 0,005 g. Heroin. hydrochlor. pro Kilogramm Körpergewicht subcutan.

Zunächst Betäubung, nach 10 Min. leicht gespannte Streckung der Extremitäten. Leichte Zuckungen. Nach $^1/_2$ Stunde Ruhelage und Erholung.

Versuch 2.

Kaninchen, 1880 g. Dosis: 0,07 g.

Nach 3 Min. klonische Krämpfe. Nach 12 Min. Tetanus. Seitenlage. Abklingen der Erregung nach $1^1/_2$ Stunden; keine Narkose bemerkbar, Erholung nach 6 Stunden.

Versuch 3.

Kaninchen, 1800 g. Dosis: 0,15 g.

Nach 5 Min. Strecken der Extremitäten. Zittern. Stürzt plötzlich auf Drahtbeinen vorwärts. Nach 9 Min. starke klonische Krämpfe; Tetanus und Exitus im Krampf.

---

[1]) Schroeder, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. 17, 96.

Nach meinen Versuchen liegt die Dosis letalis für subcutane Injektion beim Kaninchen bei 0,15 g pro Kilogramm, während bereits toxische Erscheinungen bei 0,005 g pro Kilogramm beobachtet werden.

Die Versuche zeigen ferner, daß die narkotische Wirkung des Heroins beim Kaninchen sehr zurücktritt. Es resultiert aus der stark herabgesetzten Atemfrequenz natürlich eine ausgesprochene Ruhelage, jedoch ist eine Verminderung der Reflexe oder ein Betäubungszustand kaum festzustellen. Auf Reize bewegen sich die Tiere vorwärts, ohne eine besonders auffällige Trägheit zu zeigen. Daß man durch Heroin Bilder einer ausgesprochenen Narkose — wie man sie durch Morphininjektionen erhält — nicht erzielt, liegt wohl daran, daß die Dosen, die noch nicht krampferregend wirken, auch für die narkotische Wirkung zu klein sind, während bei höheren Gaben die Erregung die Narkose verdeckt.

Entsprechende Versuche wurden an Hunden gemacht.

Versuch 4.

Hund, 3 Monate, 6,1 kg. Subcutane Injektion von 0,025 g Heroin pro Kilogramm Körpergewicht.

Kurz nach der Injektion stößt er einige leise Schmerzlaute aus, dann rasche Ermüdung; bereits nach 10 Min. tiefe Narkose, aus der er auch durch starke taktile und akustische Reize nicht geweckt werden kann. Die Narkose dauert in dieser Tiefe 30 Stunden an. Beim Erwachen ist er munter und nimmt reichlich Nahrung auf.

Versuch 5.

Hund, 3 Monate, 8 kg. Subcutane Injektion von 0,06 g pro Kilogramm Körpergewicht.

Darauf tiefer Schlaf, nur geringe Reaktion auf stärkere taktile Reize, bisweilen ganz leichte Muskelzuckungen. Durch sehr starke akustische Reize ist er aus der Narkose zu wecken. Nach 1 Stunde kann er auf Reize wieder Bewegungen machen, sinkt aber immer wieder zurück und schläft leicht ein. Nach 24 Stunden zeigt er noch erhöhte Reflexerregbarkeit sowie allgemeine Schläfrigkeit.

Versuch 6.

Hund, 4 Monate, 6,9 kg. Dosis: 0,1 g pro Kilogramm Körpergewicht subcutan.

Sofort nach der Injektion motorische Unruhe. Bauchlage, aus der er fortwährend hochspringt. Es geht Kot ab. Nach 10 Min. Seitenlage, in der er sich dauernd hin und her wirft. Reagiert auf die klein-

sten akustischen Reize mit ataktischen Bewegungen. Nach 20 Min. tiefe Narkose, Augen verdreht, leichtes krampfartiges Zittern, Andeutung von Cheyne-Stokesscher Atmung. Reflexe erhalten. Nach 30 Min. wieder vorübergehend ataktische Bewegungen mit Reaktion auf Reize, dann Zurückfallen in Narkose und dauernder Wechsel zwischen Narkose und Erregungen. Nach 6 Stunden stark erhöhte Reflexerregbarkeit bei dauernder Seitenlage. Nach 24 Stunden große Mattigkeit, liegt meist mit offenen Augen da. Nach 48 Stunden Nahrungsaufnahme, einigermaßen erholt.

Versuch 7.

Hund, 9 Monate, 10 kg. Subcutane Injektion von 0,12 g pro Kilogramm Körpergewicht.

Lebhafte Unruhe, läuft mit schleppenden Hinterextremitäten ängstlich umher. Nach 10 Minuten Bauchlage, schreckt bei jedem Geräusch zusammen, leichte Zitterbewegungen am ganzen Körper, vereinzelt krampfartiges Zusammenzucken, Schnauze halb offen, leichte Atemnot. Nach $^1/_2$ Stunde das gleiche Bild, sehr schreckhaft, häufiges Zusammenzucken. Dieser Zustand dauert unverändert fort. Nach $1^1/_2$ Stunden fällt der Kopf auf die Seite und es beginnt eine leichte Narkose. Der Erregungszustand klingt im Laufe der nächsten Tage ab, erst nach 3 Tagen erfolgt Nahrungsaufnahme, der Hund ist noch längere Zeit außerordentlich schreckhaft.

Versuch 8.

Hund, 6 Monate, 9,15 kg. Subcutan 0,15 g pro Kilogramm Körpergewicht.

Nach 5 Minuten starkes Zucken aller Muskeln, Kopf steif erhoben, Bauchlage, aus der er sich nicht erheben kann, keine Spur von Narkose. Nach 10 Min. Seitenlage, höchste Atemnot, starke klonische Krämpfe. Schnappt mit verdrehten Augen nach Luft. Starker Tetanus. Exitus 13 Min. nach Beginn der Vergiftung.

Beim Hunde liegt die letale Dosis also bei subcutaner Injektion ebenfalls bei 0,15 g Heroin pro Kilogramm Körpergewicht. Die krampferregende Wirkung des Heroins zeigt sich in gleicher Weise wie beim Kaninchen, jedoch steht bei kleinen Dosen eine ausgesprochen narkotische Wirkung im Vordergrund, und selbst bei letalen Dosen modifiziert diese Narkose noch wesentlich das Bild einer reinen Krampfwirkung. Es läßt sich also nicht bestätigen, daß, wie Mayor[1]) behauptet, das Heroin beim Hunde nur ein mäßiges Schlafmittel ist, und daß die Narkose durch das geringste Geräusch unterbrochen wird. Aus seiner Angabe, daß die leiseste Berührung ein jähes Aufzucken des Tieres zur Folge hat, läßt sich schließen, daß

---

[1]) Mayor, Therap. Monatshefte 1903, 5.

Mayor mit Dosen operiert hat, die eben bereits erregende Wirkung haben.

Die Todesursache liegt in einem Krampf der Atemmuskulatur, der zur Erstickung führt. Daß der Tod durch Erschöpfung unabhängig von der Dosis nur durch gehäufte Krampfanfälle herbeigeführt werden kann, zeigt vielleicht ein Versuch (Versuch 9), bei dem ein Kaninchen starb, das im Abstand von 6 Stunden zweimal die Dosis von 0,05 g Heroin erhielt, also eine Menge, die auch im ganzen niemals tödlich wirkte. Trotzdem starb das Tier kurz nach der zweiten Injektion im Krampf. Die Todesursache liegt hier in der langen Dauer der Krämpfe. In ähnlicher Weise sucht Dreser[1]) die Ursache der tödlichen Codeinwirkung darin, daß den durch die gehäuften Krampfanfälle gesteigerten Ansprüchen der Muskeln hinsichtlich des O-Verbrauchs die abgeschwächte Respiration nicht zu genügen vermag.

Daß die Todesursache nicht in einer Lähmung des Atemzentrums zu suchen ist, wie dies von Dreser behauptet ist, geht wohl aus folgender Versuchsanordnung hervor, bei der der Ausbruch der Krämpfe und damit auch die durch die Krämpfe herbeigeführte Erschöpfung durch Äthernarkose ausgeschaltet wurde.

Versuch 10.

Hund, 9 kg. Subcutane Injektion von 0,15 g pro Kilogramm Körpergewicht (also die letale Dosis).

Nach 5 Min. Muskelzittern in Bauchlage, nach 10 Min. Seitenlage, klonische Krämpfe. Tetanus mit maximaler Atemnot. Der Hund verdreht die Augen, alle Reflexe erloschen. Durch Äthernarkose wird der Krampf gelöst. Nach 15 Min. beginnen wieder leichte Krämpfe, nach 22 Min. erneuter Anfall: Speichelfluß, Tetanus, höchste Dyspnoe, Körper ad maximum gestreckt. Wieder Äthernarkose bis zur Lösung des Krampfes. Nach 5 Min. erneute Krämpfe, jetzt aber minder heftig. Langsam beginnt eine Erschlaffung. Die Atmung ist während der ganzen Zeit unzählbar. Die Narkose wird deutlicher, doch bleiben dauernd Zuckungen.

Am nächsten Tage dauert eine leichte Narkose noch fort, doch reagiert das Tier auf stärkere Reize.

Subcutane Injektion von 0,12 g.

Nach 15 Min. setzen wieder Zuckungen ein, Atemnot, Steigerung bis zum Tetanus. Abermals Äthernarkose, wodurch der Anfall überstanden wird. Nach 10 Min. erneute Krämpfe, doch minder lebhaft.

[1]) Dreser, Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 485.

40 Min. nach der ersten Injektion subcutane Injektion von 0,1 g pro Kilogramm Körpergewicht.

Ein Wiedereintreten des Tetanus wird wieder durch Äthernarkose aufgehoben, worauf abermals Beruhigung eintritt.

Nach 2 Stunden subcutane Injektion von 0,1 g.

Leichte Zuckungen. Die Atemnot steigert sich enorm. Das Tier keucht dauernd laut. Starker Speichelfluß. Würgbewegungen. Fällt es gelegentlich auf die Seite, so bleibt der Atem ganz weg. Die Augen treten hervor, nur mit größter Mühe gelingt es ihm, sich wieder etwas aufzurichten. Keine Krämpfe. Nach $^1/_2$ Stunde fällt er auf die Seite. Schwimmbewegungen. Exitus ohne Krämpfe.

Bei der Sektion zeigen sich alle Organe stark hyperämisch, in Lunge und Darm zahlreiche kleinste Hämorrhagien.

Bei diesem Hund, den die Injektion von 0,15 g Heroin ohne Einleiten der Äthernarkose sicher getötet hätte, ließ sich dadurch, daß die Krampfanfälle immer wieder durch Äther gelöst wurden, die letale Dosis auf 0,32 g pro Kilogramm Körpergewicht (innerhalb von ca. 3 Stunden gegeben) erhöhen.

Dies wäre aber unmöglich, wenn bereits bei 0,15 g zentrale Atemlähmung einträte. Voraussichtlich liegt die günstige Wirkung des Äthers z. T. auch in der Herabsetzung des Blutdruckes und damit des intrakraniellen Druckes.

Nach diesen Feststellungen konnten nun Gewöhnungsversuche ausgeführt werden. Hierbei wurde der Hauptwert auf die Beobachtung der Symptome gelegt, daneben in zweiter Linie die Ausscheidungsverhältnisse dauernd qualitativ durch Alkaloidreaktion geprüft. Bei der Abhängigkeit der verschiedenen Wirkungsformen von der Höhe der Dosis mußte ein Unterschied gemacht werden zwischen der Gewöhnung an kleine und an große Dosen. Bei ersteren wäre als Kriterium anzusehen das Verschwinden jeder Wirkung, bei letzteren die Möglichkeit, die letale Dosis wesentlich zu überschreiten.

Gewöhnungsversuche an Kaninchen.

Diese Gewöhnungsversuche ergaben keine sehr eindeutigen Bilder. Bei kleinen Dosen, wie sie zur Vermeidung der Krämpfe nötig sind, war die narkotische Wirkung sehr undeutlich, da beim Kaninchen die leichteren Grade der Narkose nur schwer festzustellen sind. Daher ergaben sich auch bei länger fortgesetzter Injektion keine deutlichen Unterschiede. Wurden

Tabelle I.

Nr. des Versuchs	Tier und Gewicht	Datum	Dosis	Reaktion
11	Kaninch. 1800 g	21. VI.	0,01	Keine deutliche Reaktion. Keine ausgesprochene Narkose.
		22.	0,01	do.
		23.	0,01	do.
		24.	0,01	do.
		25.	0,01	do.
		26.	0,02	Auf taktile Reize Zusammenzucken. Leichte Erregung.
		27.	0,03	Leichte Krämpfe. Abgegeben.
12	Kaninch. 1700 g	21.	0,05	Klonische Krämpfe.
		22.	0,05	do.
		23.	0,05	do.
		24.	0,05	do.
		25.	0,05	do. Gewichtsabnahme 200 g.
		26.	—	Wird tot in Krampfstellung aufgefunden.
13	Kaninch. 1320 g	30.	0,03	Ganz leichte klonische Krämpfe.
		1. VII.	0,03	do.
		3.	0,03	do.
		4.	0,03	do.
		5.	0,03	do.
		6.	0,03	do. Abgebrochen.
14	Kaninch. 1550 g	29. VI.	0,06	Klonische Krämpfe. Opistotonus.
		30.	0,06	do.
		1. VII.	0,06	do.
		3.	0,06	do. (Gewicht 1400g).
		4.	0,06	do.
		6.	0,06	Die Stärke der Krämpfe ist unvermindert. Abgegeben.
15	Kaninch. 1340 g	22. VI.	0,05	Leichte klonische Krämpfe.
		23.	0,05	do.
		24.	0,05	do. (Gewicht 1250 g).
		25.	0,05	do.
		26.	0,05	do.
		27.	0,05	do.
		28.	0,05	do.
		29.	0,05	do. (Es bleibt auch nach Erholung Zittern zurück).
		30.	0,05	do. (Gewicht 1000 g).
		1. VII.	0,05	do. Fällt leicht auf die Seite.
		2.	0,05	do.
		3.	0,05	do.
		4.	0,05	do. (Gewicht 800 g).
		6.	0,05	Atemnot. Krämpfe. Seitenlage. Exitus.

bei diesen Tieren die Dosen so weit gesteigert, daß die Grenze der krampferregenden Dosis erreicht wurde, so traten die Krämpfe ebenso prompt ein, wie bei nicht vorbehandelten Tieren. Ich habe dann versucht, mittlere Krampfdosen fortgesetzt zu injizieren, doch starben die Tiere meist nach 3 bis 5 Tagen an Erschöpfung infolge der Krämpfe unter starker Abmagerung.

Die Protokolle von einigen etwas länger ausgedehnten Versuchen zeigt Tabelle I.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Krämpfe bei länger fortgesetzter Applikation sich nicht mildern und, wenn durch die häufige Wiederholung die Resistenz des Tieres geschwächt ist, auch bei subletalen Dosen zur Todesursache werden.

Gewöhnungsversuche an Hunden.

Bei diesen Versuchen wurde so vorgegangen, daß die Injektionen nach der Mittagsmahlzeit stattfanden. Es waren dann die Tiere jedesmal zur Zeit der Nahrungsaufnahme einigermaßen erholt, so daß sich durchschnittlich ein leidlicher Ernährungszustand aufrechterhalten ließ. Es ergab sich ferner als zweckmäßig, die Tiere täglich 2 Stunden im Freien herumlaufen zu lassen und von Zeit zu Zeit ganze Tage einzuschalten, an denen sie im Freien blieben.

Aus diesen Gewöhnungsversuchen ergibt sich also zunächst, daß bei Hunden kleine Dosen bei fortgesetzter Darreichung sehr schnell wirkungslos werden. Die narkotische Wirkung, deren Dauer bei 0,025 g anfänglich 30 Stunden beträgt, ist bereits nach 5 Injektionen auf 2 Stunden Dauer zurückgegangen.

Bei vorsichtiger Steigerung kommt dann die Narkose gar nicht mehr zur Geltung, während beim nicht gewöhnten Hunde, wie oben gezeigt war, noch selbst bei letalen Dosen die narkotische Komponente der Heroinwirkung hervortritt. Auch bei sprungweiser Steigerung beim immunisierten Tier wurde vorübergehend die Narkose wieder deutlich. Wurde vorübergehend mit den Injektionen ausgesetzt (9. X.; 1. XI.), so ließen sich keine Abstinenzerscheinungen beobachten, während ein deutliches Sinken der Toleranz in diesen heroinfreien Tagen festzustellen ist.

Tabelle II.

Nr. des Versuchs	Tier und Gewicht	Datum	Dosis pro kg Körpergewicht	Symptome	Bemerkungen
16	Hund, 10 kg	22. VII.	0,03	Leichte Narkose, Dauer 6 Std.	Der Hund, der sich anfänglich ziemlich stark gegen die Injektionen sträubte, ließ sich später spritzen, ohne daß er gehalten werden brauchte. — Nach dem Aussetzen der Injektionen keine Abstinenzerscheinungen.
		23.	0,04	do. „ 6 „	
		24.	0,04	do. „ 4 „	
		25.	0,04	do. „ 3 „	
		26.	0,04	do. „ $^1/_2$ „	
		27.	0,04	do. „ $^1/_2$ „	
		28.	0,04	Keine Narkose. Leichte Schlaffheit.	
		29.	0,04	„ „	
		30.	0,04	„ „	
17	Hund, 6,1 kg	7.	0,025	Narkose 30 Std.	Seit dem 21. VII. dauernd Speichelfluß, der sich auch nach Aussetzen der Injektion erhält. — Nachher keine Abstinenzerscheinungen während einer Beobachtungsdauer von 8 Tagen.
		8.	—		
		9.	—	Erholung.	
		10.	0,025	Narkose 12 Std. Reflexe stark herabgesetzt.	
		11.	0,025	„ 7 „	
		12.	0,025	„ $2^1/_2$ „	
		13.	0,025	„ 2 „	
		14.	0,025	Träge und matt, während 3 Std. Keine Narkose.	
		15.	0,035	do. „ 2 „ „ „	
		16.	0,04	do. „ 2 „ „ „ Reflexe normal.	
		17.	0,05	do. während 3 Std. Keine Narkose.	
		18.	0,05	do. „ 2 „ „ „	
		19.	0,06	do. „ 3 „ „ „	
		20.	0,065	do. „ 3 „ „ „	
		21.	0,07	do. „ 3 „ „ „	
		22.	0,08	do. „ 3 „ „ „ Reflexe etwas gesteigert; leichtes Zucken.	
		23.	0,09	do.	
		24.	0,1	Träge. Reflexe gesteigert. Zuckung. Erholung nach 5 Std.	
		25.	0,11	Träge. Starke Reflexsteigerung. Erholung nach 5 Std.	
		26.	0,12	Krämpfe. Atemnot. Schwerer Tetanus (Äthernarkose).	
18	Hund, 9,2 kg	25. IX.	0,025	Nach 15 Min. fester Schlaf. Keine Reaktion auf taktische Reize.	
		26.	—	Dauer der Narkose 30 Std.	
		27.	0,025	„ „ „ 12 „	
		28.	0,025	„ „ „ 8 „	
		29.	0,03	„ „ „ 5 „	
		30.	0,03	„ „ „ 4 „	
		2. X.	0,03	„ „ „ 3 „	
		3.	0,04	„ „ „ 3 „	
		6.	0,04	„ „ „ 3 „	
		7.	0,04	„ „ „ 2 „	
		8.	0,04	Kein Schlaf. Nur leichte Trägheit. Der Hund liegt mit offenen Augen, reagiert träge auf Reize. Erholung nach 2 Std. Dann Nahrungsaufnahme.	

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr. des Versuchs	Tier und Gewicht	Datum	Dosis pro kg Körpergewicht	Symptome	Bemerkungen
18 (Fortsetzg.)	Hund, 9,2 kg	9. X.	0,04	Gleiches Verhalten. Erholung nach $1^1/_2$ Std.	
		13.	0,04	do. „ „ 3 „	Sinken der Toleranz.
		14.	0,04	Fast keine Reaktion.	
		15.	0,04	do.	
		17.	0,045	do.	
		18.	0,045	Keine Reaktion.	
		20.	0,045	do.	
		21.	0,05	do.	
		22.	0,05	do.	
		23.	0,065 (!)	Fester Schlaf. Nach 8 Std. völlig erholt.	
		24.	0,065	Träge, während 8 Std. keine Narkose.	
		25.	0,065	„ „ 4 „ „ „	
		26.	0,065	Leichte Betäubung, die nur der Ausdruck von motorischer Schwäche ist (wie am 8. X.). Erholung nach 2 Std.	
		27.	0,065	Leichte Betäubung. Erholung nach 2 Std.	
		28.	0,07	do. Dauer 4 Std.	
		29.	0,07	do. „ 2 „	
		30.	0,075	do. „ 2 „ Bisweilen leichtes Zusammenzucken.	
		1. XI.	0,075	do. Dauer 2 Std.	
		4.	0,075	do. „ 4 „	Sinken der Toleranz.
		5.	0,08	do. „ 3 „ Leichte Zuckungen.	
		6.	0,08	do. „ 2 „ Zittern.	
		8.	0,08	do. „ 2 „ „	
		9.	0,08	do. „ $^1/_2$ „ „	
		10.	0,085	do. „ 1 „ Zuckungen.	Gewicht 9 kg.
		11.	0,085	do. „ 1 „ „	
		13.	0,085	do. „ 1 „ „	
		14.	0,09	do. „ 1 „ Die Stärke der Zuckungen steigert sich.	
		16.	0,09	do. do.	
		18.	0,09	do.	
		20.	0,1	Nach der Injektion bleibt der Hund in Bauchlage liegen, zuckt häufig zusammen. Keine Spur von Narkose. Die Zuckungen verlieren sich nach $^1/_2$ Stde.	
		21.	0,1	do.	
		23.	0,1	do.	
		24.	0,12	Nach der Injektion läuft er unruhig umher. Wirft sich dann nieder. Reflexe erhöht. Ziemlich starkes Zusammenzucken des ganzen Tieres. Erholnug nach 3 Std.	
		26.	0,12	do.	
		27.	0,12	do.	
		29.	0,12	do.	
		30.	0,14	Bauchlage. Starkes Zittern und Zucken des Extremitäten. Reflexerhöhung.	
		1. XII.	0,14	do.	

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr. des Versuchs	Tier und Gewicht	Datum	Dosis pro kg Körpergewicht	Symptome	Bemerkungen
18 (Fortsetzg.)	Hund, 9,2 kg	3.XII.	0,15	Streckkrämpfe. Kopf hoch erhoben. Läuft mit eigentümlich gespannt gehaltenen Beinen (Drahtbeine) umher. Tetanus. Starke Atemnot. Angstschweiß. Langsames Abklingen der Symptome. Erholt sich in ca. 6 Std.	
		5.	0,17	Die gleichen Erscheinungen verstärkt, zwei tetanische Anfälle. Langsame Erholung.	Gewicht 8,8 kg.
		7.	0,18	Nach 10 Min. erster Tetanus " 15 " zweiter " " 18 " dritter " , in diesem Exitus.	

Die Heroingewöhnung scheint hiernach wesentlich flüchtiger als die Morphingewöhnung zu sein.

Andererseits zeigt sich, daß die erregende Wirkung des Heroins beim gewöhnten Tier bei der gleichen Minimaldosis eintritt wie beim nicht gewöhnten, daß die Erregung trotz fortgesetzter Injektion der gleichen Dosis sich auf der gleichen Höhe hält und sich mit steigenden Dosen unvermindert erhöht, bis schließlich mit demselben Symptomenkomplex wie beim nichtgewöhnten Tier bei der diesem entsprechenden Letaldosis der Tod eintritt. In einem Fall ergab sich allerdings die Möglichkeit, mehrmals 0,15 g pro Kilogramm zu injizieren, und der Tod wurde erst durch 0,18 g herbeigeführt. Diese Steigerung der Toleranz erklärt sich vielleicht durch den durch die Immunisierung weggefallenen lähmenden Anteil der Heroinwirkung, der beim nicht immunisierten Tier die Resistenz dem Krampf gegenüber schwächt.

Es erweist sich also die Heroinimmunität vorzugsweise als eine Gewöhnung an unterletale Dosen (ähnlich der Gewöhnung an Alkohol und Nicotin) oder, wie es Hausmann[1]) bezeichnet, als eine funktionelle Gewöhnung.

Der Grund hierfür liegt darin, daß beim Heroin, dessen Wirkungsmodus sich zusammensetzt aus einer narkotischen und einer (Krampf) erregenden Komponente, bei fortgesetzter Darreichung an die narkotische Wirkung leicht Gewöhnung ein-

[1]) Hausmann, Die Gewöhnung an Gifte. Ergebn. d. Physiol. 6, 81.

tritt, während eine Gewöhnung an die erregende Wirkung nicht beobachtet wird.

Bekanntlich ist diese Doppelwirkung, die wir beim Heroin sehen, ein Charakteristikum der ganzen Kodeingruppe; doch ist bisher wenig Wert darauf gelegt worden, wie sich bei fortgesetzter Injektion diese beiden Wirkungsweisen verhalten.

Die beim Heroin beobachtete Abstumpfung gegen die narkotische Wirkung findet ein Analogon in dem Verhalten des Kodeins, wie es aus den von Bouma mitgeteilten Protokollen hervorgeht. Wenn Bouma auch in seiner Zusammenfassung nur Wert auf das Gleichbleiben der erregenden Wirkung legt, so finden sich doch in seiner Arbeit Beobachtungen, daß bei gleichbleibender oder nur wenig gesteigerter Dosis eine anfangs ausgesprochen narkotische Wirkung allmählich mehr und mehr abnimmt, und daß schließlich beim Zurückgehen auf die Anfangsdosis die narkotische Wirkung ausbleibt (vgl. seine Versuchsreihe 1). Allerdings hat Bouma ziemlich große Dosen verwendet, bei denen die Narkose durch die Erregung schon einigermaßen verwischt ist; er hätte aber — wenn an die narkotische Wirkungskomponente keine Gewöhnung eintritt, den von v. Schroeder auch bei höheren Dosen beschriebenen Kampf zwischen Narkose und Erregung beobachten müssen. Immerhin wäre es wünschenswert, Gewöhnungsversuche mit sehr kleinen Kodeinmengen auszuführen, zumal von klinischer Seite eine Gewöhnung an die narkotische Seite des Kodeins beschrieben ist.

Diese partielle Gewöhnung an die narkotisierenden Eigenschaften der Morphinäther und -ester läßt sich mit der Hypothese, daß die Gewöhnung an Morphin allein auf einer sich steigernden Zersetzungsfähigkeit des Körpers beruht, nur schwer vereinbaren.

Bekanntlich hat Faust[1]) festgestellt, daß im Verlauf von Gewöhnungsversuchen mit Morphin an Hunden mit steigernder Gewöhnung eine Abnahme in der Morphinausscheidung bis zum schließlichen Verschwinden stattfindet, und er schloß hieraus, daß es sich bei der sog. Gewöhnung an Morphin nicht um eine Gewöhnung der Gewebe an dasselbe, sondern um das Ausbleiben der Wirkung infolge der sich immer mehr steigernden Fähigkeit des Organismus, das Morphin zu zerstören, handelt.

Diese Ansicht erhielt eine Stütze durch die erwähnte Arbeit von Bouma, der bei der fortgesetzten Einverleibung von Kodein weder Gewöhnung noch eine Verminderung in der Ausscheidung feststellen konnte.

Der Faustschen Vorstellung widersprach bereits Cloetta[2]), der in einer ausgedehnten Arbeit klarlegte, daß immunisierte Tiere nicht in

[1]) Faust, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 50, 45.

[2]) Cloetta, ebenda 50.

wesentlich höherem Grade Morphin zerstören konnten als nicht immunisierte.

Rübsamen[1]) hat dann zeigen können, daß trotz gesteigerter Zerstörung des zugeführten Alkaloids im Körper des immunisierten Tieres noch eine für toxische Wirkung genügende Menge Morphin vorhanden ist.

Schließlich fand v. Egmond[2]), daß bei den Morphingewöhnungsversuchen das Vaguszentrum eine unverminderte Empfindlichkeit behält.

Diese Tatsachen, zusammengenommen mit den oben angeführten Resultaten bei der Heroingewöhnung, lassen sich mit der Annahme eines Kausalitätszusammenhanges der Gewöhnung mit der gesteigerten Zersetzung nicht völlig erklären, sondern lassen sich nur durch die Annahme einer zellulären Abstumpfung gegen das einwirkende Gift verstehen.

Zusammenfassung.

1. Heroin wird — voraussichtlich zum größten Teil — unverändert im Harn ausgeschieden. Ein kleiner Teil erscheint im Kot als nicht näher charakterisierbares Morphinderivat.

2. Bei Gewöhnung wird das Heroin im Tierkörper in allmählich steigendem Maße zersetzt, so daß schließlich in Harn und Kot kein Alkaloid mehr nachzuweisen ist.

3. Bei Hunden tritt Gewöhnung an die narkotisierende Eigenschaft des Heroins ein, während die Empfindlichkeit gegenüber der krampferregenden Eigenschaft unverändert fortbesteht; infolgedessen ist nur Gewöhnung an unterletale Dosen möglich, d. h. die Gewöhnung ist eine funktionelle.

4. Die Dosis letalis liegt für Kaninchen und Hunde bei 0,15 g pro Kilogramm Körpergewicht. Die Todesursache liegt in der Krampfwirkung und nicht in einer zentralen Atemlähmung; denn wenn die Krämpfe durch Äthernarkose ausgeschaltet werden, läßt sich beim Hunde die Dosis letalis auf 0,32 g pro Kilogramm erhöhen.

---

[1]) Rübsamen, ebenda 59.
[2]) v. Egmond, ebenda 65.

Über Alkaloidausscheidung nach dem Magen unter dem Einfluß von in den Magen gebrachten Salzen.

Von

Hans Langer.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 27. Juli 1912.)

Gelegentlich meiner Untersuchungen über Heroingewöhnung und -ausscheidung fand ich, daß die bei mittleren toxischen Heroindosen beim Kaninchen auftretenden Krämpfe ausbleiben, wenn gleichzeitig in den Magen eine gesättigte Natriumbicarbonatlösung gebracht wird. Zur Erläuterung dienen folgende Beispiele:

Versuch 1.

Kaninchen I	Zeit	Kaninchen II
0,04 g Heroin pro Kilogramm subcutan	11^{47}	Per os 40 ccm $NaHCO_3$-Lösung subcutan 0,04 g Heroin
Streckkrämpfe in den Extremitäten	11^{49}	Keine Reaktion
Starke klonische Zuckungen . .	11^{52}	Leichte Narkose
Fibrilläre Zuckungen, Krämpfe in den Extremitäten, keine Narkose	11^{56}	Narkose dauert fort, Reflexe leicht herabgesetzt

Versuch 2.

Kaninchen III	Zeit	Kaninchen IV
Subcutan 0,07 g Heroin	11^{21}	Per os 40 ccm $NaHCO_3$ subcutan 0,07 g Heroin
Kopf erhoben, leichte Krämpfe	11^{24}	Leichte Narkose, Kopf liegt auf der Seite
Klonische Krämpfe	11^{27}	Tiefe Narkose, vereinzelt. Zucken der Extremitäten
Tetanus, Seitenlage, dauernde Erregung, später Abklingen der Erscheinungen	11^{35}	Narkose dauert an, Reflexe herabgesetzt

Diese Herabsetzung der Krampfwirkung ließ sich nur erzielen, wenn die Natriumbicarbonatlösung in den Magen gebracht wurde. Bei subcutaner oder intravenöser Injektion derselben blieb der Erfolg aus. Es wurde dadurch der Gedanke nahegelegt, daß die Herabsetzung der Wirkung zustande käme durch eine gesteigerte Ausscheidung des Alkaloids nach dem Magen. Hiernach konnte erwartet werden, daß für das Codein eine ähnliche Beeinflussung stattfände, was Versuche auch tatsächlich erwiesen. Allerdings ist beim Codein wegen der geringeren toxischen Breite die Beeinflussung nicht so deutlich wie beim Heroin.

Versuch 3.

Kaninchen V	Zeit	Kaninchen VI
Subcutan 0,07 g Codein pro Kilogramm	12^{15}	Per os 40 ccm $NaHCO_3$ subcutan 0,07 g Codein pro Kilogramm
Klonische Krämpfe bis zu langdauerndem Tetanus m. starker Atemnot	12^{30}	Keine Wirkung
Exitus	12^{50}	Vereinzelte Zuckungen in den Extremitäten
	1^{25}	Klonische Krämpfe
	1^{30}	Exitus

In diesem Versuch ist also auch eine deutliche Verzögerung der Codeinwirkung festzustellen.

Der gleiche Versuch wurde nun mit Strychnin durchgeführt. Strychnin wird bekanntlich nicht nach dem Magen hin abgeschieden; es mußte also, wenn die angegebene Anschauung richtig ist, dieser Versuch negativ ausfallen.

Versuch 4.

Kaninchen VII	Zeit	Kaninchen VIII
Subcutan 0,8 mg Strychnin pro Kilogramm	10^{42}	Per os 50 ccm $NaHCO_3$ subcutan 0,8 mg Strychnin pro Kilogr.
Starkes Zittern, Tetanus, Seitenlage, dann dauernd tetanische Anfälle bis zum Exitus	10^{46} 10^{56}	Tetanus, die tetanischen Anfälle wiederholen sich in kurzen Abständen bis zum
	11^{10}	Exitus

Beim Strychnin bleibt also die Beeinflussung durch Natriumbicarbonat aus.

Die Bicarbonatwirkung läßt sich nur verstehen, wenn man annimmt, daß unter ihrem Einfluß der osmotische Druck in der Weise verändert wird, daß eine stärkere Flüssigkeitsabsonderung nach dem Magen eintritt, d. h. allgemein, daß es sich um eine Salzwirkung handelt. Zum experimentellen Beweis hierfür wurde die Natriumbicarbonatlösung durch eine 10%ige NaCl-Lösung ersetzt.

Versuch 5.

Kaninchen IX	Zeit	Kaninchen X
0,07 g Heroin pro Kilogramm .	11^{57}	Per os 50 ccm 10% NaCl subcutan 0,07 g Heroin pro Kilogramm
Streckung der Extremitäten, Zittern, Atemnot	12^{00}	Ruhelage, Kopf sinkt zu Boden
Klonische Krämpfe	12^{02}	Leichte Betäubung
Tetanus, Seitenlage	12^{03}	
Seitenlage, dauernde Zuckungen	12^{07}	Es beginnt eine leichte Erregung
Starke Zuckungen	12^{12}	Keine Steigerung der Erregung
Langsames Abklingen d. Wirkung	12^{37}	Ohne daß eine stärkere Erregung hervortritt, klingt die Wirkung langsam ab

Es ergab sich also aus diesen Versuchen, daß eine in den Magen gebrachte Salzlösung zu einer Herabsetzung der Giftwirkung bei den Morphinderivaten führt und es ließ sich nun erwarten, daß man nach einer gegebenen Zeit im Mageninhalt dieser Tiere eine größere Menge des injizierten Alkaloids wiederfinden würde als im Mageninhalt eines normalen Tieres, das die gleiche Menge Alkaloid erhalten hatte. Diesen Unterschied zu erweisen, war beim Heroin aus Mangel an einer quantitativen Heroinbestimmungsmethode unmöglich. Es wurde daher der Nachweis für Morphin durchgeführt. Die Versuchsanordnung war folgende:

Es wurde einem Kaninchen 50 ccm 10%iger Kochsalzlösung mit der Schlundsonde eingeführt und darauf intravenös eine möglichst große Menge Morphin injiziert. Das Kontrolltier erhielt die gleiche Menge Morphin und in den Magen das der Kochsalzlösung entsprechende Quantum Wasser. Nach 1 Stunde wurden beide Tiere getötet und der Magen

mit dem obersten Teil des Duodenums herausgenommen. Der Mageninhalt wurde mit HCl-haltigem Wasser versetzt, mehrere Stunden digeriert und dann koliert. In der Flüssigkeit wurde nun die Morphinbestimmung nach Tauber[1]) durchgeführt. Bei der von Tauber angegebenen Ausfällung des Morphins durch Na_4CO_3 fiel das Morphin außerordentlich langsam und in so geringer Menge aus, daß vorgezogen wurde, das Morphin aus dieser alkalischen Lösung mit heißem Chloroform auszuschütteln. Der Chloroformauszug wurde in einem gewogenen Glasschälchen verdunstet und der Rückstand gewogen.

Bestimmung I.

Kaninchen XI per os 50 ccm Wasser, intravenös 0,325 g Morphinum sulf. (= 0,262 Morphin).
Die Analyse des Mageninhalts ergibt **0,034** g Morphin = **13** %.

Kaninchen XII per os 50 ccm NaCl; intravenös 0,325 g Morphinum sulf. (= 0,262 Morphin).
Die Analyse des Mageninhalts ergibt **0,056** g Morphin = **21** %.

Bestimmung II.

Kaninchen XIII per os 50 ccm Wasser, intravenös 0,25 g Morphin. sulf. (= 0,201 g Morphin).
Die Analyse ergibt **0,0398** g Morphin = **20** %.

Kaninchen XIV per os 50 ccm NaCl-Lösung; intravenös 0,25 g Morphin. sulf. (= 0,201 g Morphin).
Die Analyse ergibt **0,0877** g Morphin = **43** %.

In dem zweiten Falle wurde außerdem zur Kontrolle die titrimetrische Alkaloidbestimmung nach Gordin durchgeführt. Diese ergab für Kaninchen XIII **0,03014** g Morphin, für Kaninchen XIV **0,07124** g Morphin. Es ist also unter dem Einfluß der Salzwirkung nach 1 Stunde die doppelte Menge Morphin nach dem Magen abgeschieden wie beim Kontrolltier.

Hiermit ist also erwiesen, daß man die Ausscheidungsbedingungen der Morphinderivate und damit ihre Wirkung beeinflussen kann dadurch, daß man Salzlösungen in genügender Konzentration in den Magen bringt. Auch die Wirkungsdauer wird zweifellos durch die Salze beeinflußt. Es zeigte sich nämlich, daß bei Einführung von Salz die Wirkung des Heroins der Stärke nach herabgesetzt, der Dauer nach protrahiert erschien. Man wird also annehmen müssen, daß ein Teil des in den Magen abgeschiedenen Heroins im Darm wieder rückresor-

[1]) Tauber, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 27.

biert wird, wofür auch die Tatsache spricht, daß Heroin zum größten Teil durch die Harnwege ausgeschieden wird.

Die Feststellung der Steigerung der stomachalen Ausscheidung unter dem Einfluß der Salzwirkung ist in Parallele zu bringen mit der von Crudden[1]) untersuchten Beeinflussung der Morphinausscheidung durch einige die Magen-Darmschleimhaut reizende Mittel. Bei der quantitativen Untersuchung der Faeces fand er bei gleichzeitiger Einführung von Rad. Senegae und Rad. Quillajae ca. 20°/₀ mehr Morphin als bei Tieren, denen nur Morphin gegegeben war. Allerdings scheint die Salzwirkung, die in der Hauptsache als Beeinflussung des osmotischen Drucks aufzufassen ist, erheblich stärker zu sein. Es ließ sich wenigstens beim Heroin keine Modifizierung der Wirkung konstatieren, wenn an Stelle der Salzlösung eine Senföllösung in den Magen gebracht wurde. Schließlich sei erwähnt, daß die Beeinflussung der Ausscheidung, wie sie hier für Morphinderivate festgestellt ist, nicht ohne weiteres auf andere Substanzen übertragen werden kann, die in den Magen ausgeschieden werden. Wenigstens ergab eine entsprechende Versuchsanordnung mit Injektion von Jodkalium bei der quantitativen Jodbestimmung nach Rabourdin-Baumann[2]) keine Differenz in der nach dem Magen hin abgeschiedenen Jodmenge.

---

[1]) Crudden, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 62, 374.
[2]) Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22.

Über Einwirkung von Ammoniaksalzen und essigsauren Salzen auf den Stickstoffwechsel des Fleischfressers.

Von

Ernst Pescheck.

(Aus dem zootechnischen Institut der Kgl. landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 29. Juli 1912.)

Die Frage, welchen Einfluß Ammoniaksalze auf den Stickstoffumsatz des tierischen Organismus auszuüben vermögen, ist in neuester Zeit wieder Gegenstand eingehender Studien geworden. Was die Literatur anbetrifft, so verweise ich auf meine Angaben in Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 142, 143ff., 1911 Seitdem sind nun weitere Arbeiten erschienen, die ich zuerst kurz erwähnen möchte.

Da liegen zunächst von Morgen[1]) und seinen Mitarbeitern neue Versuche, im wesentlichen eine Wiederholung der im Jahre 1909 angestellten, vor. Die Ergebnisse dieser letzten Arbeit bestätigen im vollen Umfange die früheren Befunde. Sowohl Ammonacetat- wie Asparagin-N war nicht nur zur Lebenderhaltung, sondern auch für die Produktion von Milch, Wolle und Fleisch verwertet worden. Wie schon im vorjährigen Bericht, führen die Verfasser diese Wirkung auf eine durch Bakterien im Pansen bewirkte Umbildung des Ammonacetat- resp. Asparaginstickstoffs zu Eiweiß zurück.

Des ferneren erschien in der Zeitschr. f. physiol. Chem. eine Arbeit von Grafe und Schlaepfer[2]) über Stickstoffretention und Stickstoffgleichgewicht bei Fütterung mit Ammoniaksalzen.

---

[1]) Landw. Versuchsstationen 75, 265, 1911.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 1, 1912.

Einleitend widmen die Herren Verfasser u. a. meinen im September vergangenen Jahres im Arch. f. d. ges. Physiol. publizierten Versuchen einige kritische Bemerkungen, die ich nicht unerwidert lassen möchte. Sie bemängeln die so sehr schwankenden Resultate, die ich bekommen habe, sowie die zu reichlichen Rationen, die ich meinen Tieren gab. Die Herren Verfasser übersehen, daß es gerade mein Zweck war die Wirkung des Ammonacetats unter verschiedenen Bedingungen festzustellen, sogar unter Bedingungen, wo das Salz toxisch wirkte; vgl. meine intravenösen Injektionen. Unter diesen Verhältnissen mußten die Resultate der einzelnen Versuchsreihen natürlich verschieden ausfallen.

Wenn ich im übrigen meinen Hunden allgemein reichliche Rationen gab, so tat ich dies einmal aus demselben Grunde, der die Herren Autoren veranlaßte, bei ihren Versuchen das Calorienbedürfnis weit übersteigende Rationen zu verfüttern, um nämlich genügend stickstofffreies Material, das erfahrungsgemäß einen ev. Stickstoffansatz begünstigt, zur Verfügung zu stellen. (Grafe bezeichnet selbst in der Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, S. 501, größere Gaben von 100 bis 150 Cal. pro 1 kg Lebendgewicht als den springenden Punkt zum Gelingen solcher Versuche.) Andererseits durfte ich schon deshalb nicht zu wenig Calorien geben, weil meine Tiere auch Fleisch bekamen, und ein zu enges Nährstoffverhältnis nach Möglichkeit vermieden werden mußte. Wenn ich die Herren Autoren auf diese Punkte hier noch einmal besonders aufmerksam gemacht habe, glaube ich, daß bei abermaliger Betrachtung meiner Versuche die Herren wohl zu einem anderen Schlusse kommen würden, ja vielleicht finden sie dann doch eine exakte Deutung meiner Versuche im Bereiche der Möglichkeit liegend.

Grafe und Schlaepfer haben nun selbst Versuche mit Ammoniaksalzen beim Fleischfresser angestellt, um N-Retentionen resp. N-Gleichgewicht zu erzielen. Sie gaben Chlorammonium resp. Ammoniumcitrat als einzige Stickstoffnahrung zu einem praktisch stickstofffreien Futter aus Kohlenhydraten, Fett, etwas Fleischextrakt, Bouillon usw. bestehend, pro 1 kg Lebendgewicht 100 bis 150 Cal. und fanden N-Retentionen. Mit größeren Mengen Ammoncitrat gelang es ihnen sogar, für längere Zeit N-Gleichgewicht zu erzielen.

Abderhalden[1]) hat ähnliche Versuche angestellt. Er gab zu einem sticktofffreien Futter, aus Kohlenhydraten und Fett bestehend, als N-Zulage Ammoniumcarbonat und Ammoniumacetat und erzielte N-Retentionen.

In einer anderen Arbeit gelang es Grafe[2]) gleichfalls, mit citronensaurem Ammoniak als einziger Nahrung in einem 3 Monate währenden Versuche einen deutlich günstigen Einfluß auf den Stickstoffumsatz nachzuweisen.

Die nachfolgenden weiteren Versuche von mir wurden zum Teil in Anlehnung an frühere Amidversuche des zootechnischen Instituts angestellt.

Übersicht über die angestellten Versuche.

A. Versuche mit Ammoniaksalzen.

1. Versuch (Hündin 5). Stickstoffwechsel bei langsamer und schnellerer Injektion von milchsaurem Ammoniak in den Magen (5 Perioden).

2. Versuch (Hündin 9). Stickstoffwechsel bei Zulage von milchsaurem Ammoniak zu einem Grundfutter (2 Perioden).

3. Versuch (Hündin 6). Stickstoffwechsel bei Zulage von essigsaurem Ammoniak zu einem durch Rohfaserbeigabe voluminöser gemachten Grundfutter (10 Perioden).

B. Versuche mit essigsauren Salzen.

4. Versuch (Hündin 6). Stickstoffwechsel bei Zulage von Natriumacetat zu einem Grundfutter (3 Perioden).

5. Versuch (Hündin 5). Stickstoffwechsel bei Zulage eines Gemisches von Na-, K-, Ca- und Mg-Acetat zu einem Grundfutter (5 Perioden).

6. Versuch (Hündin 6). Stickstoffwechsel bei Zulage von Calciumacetat zu einem Grundfutter (3 Perioden).

Rosenfeld[3]) und Müller[4]) waren bei Fütterungsversuchen mit Asparagin an Hunden, die sie im zootechnischen Institut

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 1, 1912.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 485, 1912.
[3]) Arch. f. d. ges. Physiol. 112, 339, 1906.
[4]) Ebenda 117, 497, 1907.

ausgeführt hatten, zu besonders günstigen Ergebnissen dann gekommen, wenn sie das Amid durch Einhüllen in Celloidin schwerer löslich gemacht hatten. Rosenfeld[1]) hatte auch gefunden, daß Asparagin-N bei Gegenwart von viel Rohfaser vom Fleischfresser besser verwertet wird. Die Verfasser führen ihre im Vergleich mit anderen Asparaginversuchen außerordentlich günstigen Ergebnisse darauf zurück, daß durch die Celloidinhülle die Lösung des Asparagins im Magendarmkanal erschwert resp. durch die große Beigabe von Rohfaser, die für den Fleischfresser nur als Ballast in Betracht kommt, die Resorption des relativ leicht löslichen Salzes verlangsamt worden ist. Dadurch wurde der Organismus vor einer Überschwemmung mit dem Amid und damit verbundenen schlechteren Ausnutzung des Stickstoffs bewahrt.

In Anlehnung an diese Versuche sollte geprüft werden, ob vielleicht Ammoniaksalze einen ähnlich günstigen Einfluß auf den N-Umsatz auszuüben vermögen, wenn das Salz relativ langsam dem Körper zugeführt wird. Obgleich durch die Einhüllung von Asparagin in Celloidin resp. Beigabe von viel Rohfaser die Resorption wohl verlangsamt werden kann, so ist man doch bei dieser Versuchsanstellung nicht in der Lage, die Schnelligkeit der Zufuhr des Salzes genau zu regeln. Um nun die Möglichkeit zu haben, eine bestimmte Menge Salz in einer bestimmten Zeit dem Tiere einverleiben zu können, sollte das gelöste Ammoniaksalz dem Tiere in den Magen injiziert werden, und zwar vergleichsweise einmal relativ langsam, innerhalb von 6 Stunden, und dann auch schneller, innerhalb 1 Stunde. Wenn diese Versuchsanstellung auch gegenüber der von Müller und Rosenfeld befolgten Methode den Vorteil hat, daß sich die Menge des dem Körper zugeführten Salzes und die Zeit der Einverleibung genau regulieren läßt, so erreicht man auf diese Weise doch nicht eine so gleichmäßige Verteilung der Salzlösung in dem Futterbrei im Magen, wie es bei Müller und Rosenfeld der Fall war. Dies ist deshalb vielleicht von Bedeutung, weil, insofern bakterielle Einwirkungen vor der Resorption überhaupt eine Rolle spielen, diese in dem folgenden Versuche wahrscheinlich abgeschwächt waren.

---

[1]) Dissertation, Heidelberg 1900.

Betreffs der Methodik kann ich auf meine früheren Angaben verweisen. In Kürze sei nochmals wiederholt.

Der Stickstoffgehalt der Futterstoffe wurde nach Kjeldahl bestimmt, die Calorien, wenn nicht anders angegeben, durch Verbrennen in der calorimetrischen Bombe (Berthelot-Mahler-Kroeker-Bombe). Das Pferdefleisch wurde in größeren Mengen (25 kg) in gehacktem Zustande auf einmal bezogen und nach Entnahme einer Durchschnittsprobe zur Analyse in Konservengläser zu 400 g eingewogen und im strömenden Dampf sterilisiert.

Die Hunde wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten, deren Einrichtung bekannt ist. Täglich früh zur bestimmten Stunde grenzte ich den Harn ab. Die Blase wurde mittels Katheter entleert und mehrmals mit sterilem Wasser von 37 bis 40° C ausgespült. Darauf mußten die Tiere 3 km auf der horizontal gestellten Tretbahn laufen, was sie nach kurzer Gewöhnung alle sehr gerne tun. Sie waren dazu erzogen worden, hierbei den Kot abzusetzen, was sie auch täglich taten (s. ev. unter „Bemerkungen“ in den Tabellen). Dann wurden die Tiere gewogen und kamen wieder in den Käfig. Mittags zur bestimmten Stunde gab ich ihnen das Futter, das sie im allgemeinen sofort restlos fraßen.

Betreffs der Analyse der Ausscheidungen der Tiere wäre noch zu erwähnen, daß die zu einem Versuchstage gehörende Harnmenge und das zum Nachwaschen des Käfigs gebrauchte Spülwasser auf ein bestimmtes Volumen ($1^1/_2$ oder 2 l) aufgefüllt und nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht wurde. Der Kot wurde periodenweise mit Knochen oder Kieselsäure abgegrenzt. Wenn die Abgrenzung mit Kieselsäure erfolgte, gab ich den Tieren, um ev. fehlende Salze zu ergänzen, eine Messerspitze eines Salzgemisches in das Futter, wie es Caspari im Tigerstedt[1]) angibt. Die zu einer Versuchsperiode gehörende Kotmenge wurde mit Salzsäure angesäuert, gut durchgemischt, gewogen und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

1. Versuch.

Stickstoffwechsel bei langsamer und schnellerer Injektion von milchsaurem Ammoniak in den Magen.

Als Versuchstier diente eine ausgewachsene Hündin 5.

Die dem Tiere verabreichten Futterstoffe hatten folgenden N- und Caloriengehalt[2]):

Makkaroni	1,50 % N	3,806 Cal.
Schmalz	— „ „	9,622 „
Knochen	5,32 „ „	1,805 „

[1]) Tigerstedts Handb. d. physiol. Methodik 1, Abt. 3, S. 50: K_2HPO_4 45 %, $MgHPO_4$ 20 %, NaCl 10 %, $CaCO_3$ 24 %, $Fe(OH)_3$ 1 %.

[2]) Der Caloriengehalt bezieht sich auf 1 g der betreffenden Substanz.

Parmesankäse	8,27 % N	6,867 Cal.
Milchsaures Ammoniak . . .	10,55 „ „	[1]) „
Traubenzucker	— „ „	3,412 „

Das Grundfutter hatte folgende Zusammensetzung:

I. Periode. Grundfutter.

250 g	Makkaroni	3,75 g N	951,50 Cal.
5 „	Parmesankäse	0,41 „ „	34,34 „
20 „	Schmalz	— „ „	192,44 „
10 „	Traubenzucker	— „ „	34,12 „
2 „	Kochsalz	— „ „	— „
2 „	Knochen	0,11 „ „	3,61 „
		4,27 g N	1216,01 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	. . .	0,39 „ N	111 „

Nachdem das Tier längere Zeit das Grundfutter erhalten hatte, wurde am 11. Mai 1911 der Versuch begonnen.

Leider ist dieser Versuch insofern unvollständig, als ich bei der Aufstellung der N-Bilanzen den N-Gehalt des Kotes unberücksichtigt gelassen habe. Der N-Gehalt des Kotes der einzelnen Perioden zeigt nämlich nicht unbedeutende Schwankungen (0,68 g; 0,56 g; 0,44 g; 0,67 g; 0,62 g), so daß ich die Befürchtung habe, daß diese Zahlen fehlerhaft sein könnten. Es war nämlich auffällig, daß die sonst sehr deutlich erkennbare Kotabgrenzung mit Knochen oder Kieselsäure fast nie mit Sicherheit konstatiert werden konnte. Ich befürchte deshalb, daß die Hündin Kot im Käfig abgesetzt und wieder gefressen hat. Wenn dadurch auch der N-Gehalt des Harnes, durch ev. noch aus dem Kot resorbierten N, kaum verändert werden dürfte, so würden doch andererseits die N-Zahlen des Kotes deshalb unsicher sein, weil die den verschiedenen Perioden angehörenden Kotmengen dann nicht mehr richtig getrennt werden konnten. Da es ferner nicht sehr wahrscheinlich ist, daß milchsaures Ammoniak auf die N-Ausscheidung im Kot einen Einfluß auszuüben vermag, möchte ich nicht eher diese Zahlen diskutieren, bis ich sie durch einen Kontrollversuch bestätigt gefunden habe.

Da der N-Gehalt des Harnes den N-Umsatz erkennen läßt, so möchte ich den Versuch trotz der erwähnten Unsicherheit, die die Aufstellung von Gesamt-N-Bilanzen nicht gestattet, dennoch veröffentlichen.

[1]) Die Calorien sind berechnet auf die an Ammoniak gebundene Milchsäure; 1 g Milchsäure = 3,661 Cal.

Tabelle I[1]).

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Differenz g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
11.—12. V.	4,27	3,20	+ 1,07	10,63	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
12.—13. „	4,27	2,94	+ 1,33	10,76	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
13.—14. „	4,27	3,19	+ 1,08	10,76	
14.—15. „	4,27	2,93	+ 1,34	10,71	
15.—16. „	4,27	3,17	+ 1,10	10,93	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
16.—17. „	4,27	3,15	+ 1,12	10,81	10 g Knochen gegeben.
17.—18. „	4,27	2,80	+ 1,47	10,92	
18.—19. V.	4,27	3,44	+ 0,83	10,82	
19.—20. „	4,27	3,19	+ 1,08	10,92	
20.—21. „	4,27	3,14	+ 1,13	10,98	
21.—22. „	4,27	3,14	+ 1,13	11,00	
22.—23. „	4,27	3,47	+ 0,80	10,94	4 g Knochen gegeben.
		37,76	+ 13,48	129,88	
Mittel von 12 Tagen	4,27	3,15	+ 1,12	10,82	

Mittelzahlen aus den letzten 5 Tagen (18./19.—22./23.) der Periode.

		16,38	+ 4,97	54,66
Mittel von 5 Tagen	4,27	3,28	+ 0,99	10,93

Der N-Gehalt des Kotes, den ich aus den eben erwähnten Gründen nicht in der Tabelle angegeben habe, betrug für diese Periode im Mittel 0,68 g (höchster Wert für Kot-N in diesem Versuche). Betrachtet man die N-Ausscheidung im Harn, des besseren Vergleiches wegen mit den folgenden, 5 Tage währenden Perioden, nur an den letzten 5 Tagen dieser Periode, so ergibt sich im Mittel pro Tag 3,28 g N. Aus den N-Ausscheidungen ist ersichtlich, daß die Bilanz positiv ist. Das Tier hat also N retiniert. Das Lebendgewicht ist während der ganzen 12 tägigen Periode beständig gestiegen, von 10,63 kg auf 10,94 kg.

[1]) Die Tabellen bedürfen keiner weiteren Erklärung. Die einzelnen Versuchstage sind mit zwei Daten bezeichnet, weil von 9 resp. 10 Uhr des einen Tages bis zur selben Zeit des anderen Tages ein Versuchstag dauerte. Die Angaben in den Bemerkungen über Kotabsetzen der Tiere bezwecken im wesentlichen eine ev. Erhöhung des Lebendgewichtes zu erklären.

In der nun folgenden II. Periode wurden dem Tiere 50 ccm Ringerlösung[1]), die 1 g N in Form von milchsaurem Ammoniak enthielten, in den Magen innerhalb 6 Stunden injiziert.

Zu diesem Zwecke war der Hündin die Magenwand an einer Stelle an die Bauchwand angenäht worden. Durch Einstechen mittels eines feinen silbernen Trokars von außen, gelang es in den Magen zu kommen. Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß die Hündin bei diesem täglichen Einstechen keinerlei Unbehagen zeigte.

II. Periode.

Grundfutter	4,27 g N	1216,01 Cal.
Ammonlactat (6,41 g Milchsäure) .	1,00 „ „	23,47 „
	5,27 g N	1239,48 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,48 „ N	113 „

Tabelle II.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Differenz g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
23.—24. V.	5,27	4,24	+ 1,03	11,10	Mit Kieselsäure Kot abgegrenzt. Dem Futter täglich 2 g Knochen zugesetzt.
24.—25. „	5,27	4,11	+ 1,16	11,03	
25.—26. „	5,27	4,20	+ 1,07	11,07	
26.—27. „	5,27	4,39	+ 0,88	11,11	
27.—28. „	5,27	4,08	+ 1,19	11,05	
		21,02	+ 5,33	55,36	
Mittel pro Tag	5,27	4,20	+ 1,07	11,07	

Der Kot der II. Periode enthält im Mittel pro Tag 0,56 g N, also 0,12 g weniger als der in der vorhergehenden Periode. Der N-Gehalt des Harns läßt erkennen, daß der gesamte Lactat-N bis auf 0,08 g wieder zur Ausscheidung gekommen ist. Eine N-einschränkende Wirkung ist nach den Harn-N-Zahlen in nennenswertem Maße also nicht zu verzeichnen.

In der nun anschließenden III. Periode wurde wieder das Grundfutter gegeben.

III. Periode.

Grundfutter	4,27 g N	1216,01 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,38 g N	108 „

[1]) 16 g NaCl; 0,2 g $CaCl_2$; 0,15 g KCl; 0,2 g $KHCO_3$ mit aq. dest. zu 2 l aufgefüllt.

Tabelle III.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Differenz g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
28.—29. V.	4,27	(2,75)	+ 1,52	11,13	Mit Kieselsäure Kot abgegrenzt.
29.—30. „	4,27	3,29	+ 0,98	11,19	
30.—31. „	4,27	3,28	+ 0,99	11,21	
31. V.—1. VI.	4,27	3,25	+ 1,02	11,28	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
1.—2. „	4,27	3,15	+ 1,12	11,32	
		15,72	+ 5,63	56,13	
Mittel pro Tag	4,27	3,14	+ 1,13	11,23	
		12,97	+ 4,11		
Mittel aus den letzt. 4 Tagen	4,27	3,24	+ 1,03	11,25	

Im Kot schied das Tier in dieser Periode 0,44 g N aus. Auffällig ist die N-Ausscheidung im Harn am 1. Tage (28./29. V.). Während die übrigen N-Zahlen des Harns denen der 1. Periode vergleichbar sind, zeigt sich am 1. Tage eine erheblich geringere N-Ausscheidung. Wollte man daraus auf eine durch die vorhergehenden Lactatgaben verursachte nachträgliche Einschränkung des Stickstoffumsatzes schließen, so wäre diese doch, da sie sich nur auf einen Tag erstreckt, bedeutungslos. Lasse ich den ersten Tag bei Berechnung der Mittelzahlen fort, so ergeben sich Werte, die denen der I. Grundfutterperiode entsprechen.

IV. Periode.

Grundfutter	4,27 g N	1216,01 Cal.
Ammonlactat (6,41 g Milchsäure) .	1,00 „ „	23,47 „
	5,27 g N	1239,48 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,46 „ N	109 „

Tabelle IV.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Differenz g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
2.—3. VI.	5,27	4,32	+ 0,95	11,31	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
3.—4. „	5,27	4,10	+ 1,17	11,31	
4.—5. „	5,27	3,90	+ 1,37	11,34	
5.—6. „	5,27	4,05	+ 1,22	11,38	
6.—7. „	5,27	4,07	+ 1,20	11,40	
		20,44	+ 5,91	56,74	
Mittel pro Tag	5,27	4,09	+ 1,18	11,35	

In der nun folgenden IV. Periode wurden dem Tiere wieder wie in Periode II 50 ccm Ringerlösung, enthaltend 1 g N, in Form von milchsaurem Ammoniak in den Magen injiziert, diesmal aber innerhalb 1 Stunde.

Im Vergleich mit Periode II zeigt sich, daß 0,11 g N im Mittel pro Tag weniger im Harn zur Ausscheidung gekommen sind. Im Kot wurden pro Tag im Mittel 0,67 g N ausgeschieden. Die schnellere Zufuhr hat jedenfalls keine ungünstigere Wirkung gezeigt. Auf eine beachtenswerte stickstoffeinschränkende Wirkung des Salzes läßt sich aus der geringen Retention von 0,11 g N nicht mit Sicherheit schließen.

Zur Erkennung einer ev. Nachwirkung wurde wieder das Grundfutter gegeben.

V. Periode.

Grundfutter	4,32 g N	1217,82 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,38 g N	106 „

Tabelle V.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Differenz g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
7.—8. VI.	4,32	3,22	+ 1,10	11,45	6 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
8.—9. „	4,32	3,20	+ 1,12	11,55	
Mittel pro Tag	4,32	3,21	+ 1,11	11,50	

Eine Nachwirkung läßt sich nicht erkennen. Im Mittel hat das Tier 0,62 g N pro Tag im Kot ausgeschieden. Der N-Umsatz entspricht dem der übrigen Grundfutterperioden. Das Lebendgewicht des Tieres hat während des Versuches beständig zugenommen, von 10,63 kg bis auf 11,55 kg.

Als Resultat ergibt sich, daß milchsaures Ammoniak in diesem Versuch nach der Stickstoffausscheidung im Harn eine irgendwie beachtenswerte Stickstoffretention nicht hat erkennen lassen.

Leider ist dieser Versuch wegen der eingangs erwähnten wahrscheinlichen Unsicherheit der N-Zahlen für Kot, die ich deshalb in den Tabellen nicht angeführt habe, unvollständig. Es war deshalb erforderlich, bei einem anderen Tiere nachzuprüfen, ob milchsaures Ammoniak auf die Stickstoffausscheidung im Kot einen Einfluß auszuüben vermag.

2. Versuch.

Stickstoffwechsel bei Zulage von milchsaurem Ammoniak zu einem Grundfutter.

Zu diesem Versuch nahm ich eine ausgewachsene Dalmatinerhündin 9.

Die Futterstoffe hatten folgenden N- und Caloriengehalt:

Pferdefleisch	3,43 % N	1,632 Cal.
Reis	1,33 „ „	3,759 „
Schmalz	— „ „	9,622 „
Milchsaures Ammoniak . . .	10,55 „ „	— „

Die Hündin bekam zunächst wieder ein Grundfutter von folgender Zusammensetzung:

I. Periode. Grundfutter.

80 g Pferdefleisch	2,74 g N	133,04 Cal.
80 „ Reis	1,06 „ „	300,72 „
40 „ Schmalz	— „ „	386,80 „
2 „ Kochsalz	— „ „	— „
	3,80 g N	820,56 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,36 „ N	77 „

Nach längerer Vorfütterung begann am 23. XI. der Versuch.

Tabelle VI.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
23.—24. XI.	3,80	2,88	0,55	3,43	+ 0,37	10,50	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
24.—25. „	3,80	2,99	0,55	3,54	+ 0,26	10,59	
25.—26. „	3,80	2,93	0,55	3,48	+ 0,32	10,63	
26.—27. „	3,80	—	0,55	—	—	10,64	Urinierte auf die Erde.
27.—28. „	3,80	2,89	0,55	3,44	+ 0,36	10,63	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
28.—29. „	3,80	2,85	0,55	3,40	+ 0,40	10,67	
		14,54		17,29	+ 1,71	63,66	
Mittel pro Tag	3,80	2,91	0,55	3,46	+ 0,34	16,61	

Trotz der mäßigen Gaben von 0,36 g N und 77 Calorien pro 1 kg Lebendgewicht vermochte das Tier noch 0,34 g N zu retinieren. Das Lebendgewicht hat zugenommen (10,50 kg am 1. Tage; 10,67 kg am 6. Tage).

In der anschließenden II. Periode bekam das Tier 1 g N in Form von milchsaurem Ammoniak in das Futter.

II. Periode.

Grundfutter	3,80 g N	820,56 Cal.
Ammonlactat (6,41 g Milchsäure) .	1,00 „ „	23,47 „
	4,80 g N	844,03 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,45 „ N	79 „

Tabelle VII.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
29.—30. XI.	4,80	—	0,57	—	—	10,70	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt. An beiden Tagen Harnverluste; Tier urinierte auf die Erde.
30.XI.–1.XII.	4,80	—	0,57	—	—	10,62	
1.—2. XII.	4,80	4,04	0,57	4,61	+ 0,19	10,57	
2.—3. „	4,80	4,19	0,57	4,76	+ 0,04	10,66	
3.—4. „	4,80	4,23	0,58	4,80	± 0	10,72	
4.—5. XII.	4,80	4,19	0,57	4,76	+ 0,04	10,77	
		16,65		18,93		64,04	
Mittel pro Tag	4,80	4,16	0,57	4,73	+ 0,07	10,67	

Von + 0,34 g N ist die Bilanz auf + 0,07 g N gesunken. Das Tier befindet sich also praktisch im N-Gleichgewicht. Das Lebendgewicht hat sich um 60 g im Mittel gegen Periode I vermehrt.

Leider fand dieser Versuch hier seinen Abschluß, da das Tier das Futter nicht mehr aufnahm. Nachdem das Tier aus dem Versuch ausgeschaltet war, magerte es merklich ab. Es stellten sich starke Diarrhöen ein. Außerdem schien das Tier innere Schmerzen zu haben. Mehrere Male bekam es krampfartige Zustände. Trotzdem erholte sich die Hündin immer wieder. Nahrung nahm das Tier fast nicht mehr auf. Am 8. I. 1912 frühmorgens fand ich die Hündin tot vor. Die Sektion ergab schwere Darmtuberkulose. Eine Niere war bedeutend kleiner. Im Innern dieser fanden sich graue Steine vor, die im wesentlichen aus Harnsäure bestehen. Dieser letztere Befund war insofern interessant, als die Hündin während des Versuches täglich beträchtliche Mengen Harnsäure abgeschieden hatte. Jeden Morgen fand sich im Harnglas unter dem Stoffwechselkäfig ein Bodensatz von Krystallen, die sich unter dem Mikroskop als Harnsäurekrystalle unschwer erkennen ließen. Mit Spuren solcher Krystalle erhielt ich eine sehr kräftige Murexidreaktion. Die Krystalle wurden täglich in heißem Wasser gelöst und der betreffenden Tagesportion zugesetzt.

Dieses Tier, mit schwerer Darmtuberkulose behaftet und einer verkümmerten Niere, kann natürlich nicht als einwandfreies Versuchstier gelten. Der Versuch hat deshalb nur bedingten Wert und kann schon wegen seiner Kürze nicht als Kontrollversuch des vorhergehenden gelten. Durch äußere Umstände war ich leider bisher verhindert, eine Wiederholung dieses Versuches vorzunehmen.

Wie schon früher erwähnt, hatte **Rosenfeld** eine bessere Verwertung des Asparaginstickstoffs bei Hunden gefunden, wenn er das Salz mit viel Rohfaser zusammen verfütterte. Im folgenden Versuche prüfte ich, ob sich auch mit Ammonacetat eine günstigere Wirkung erzielen läßt, wenn das Salz in einem durch viel Rohfaser voluminöser gemachten Futter verabreicht wird.

3. Versuch.

Stickstoffwechsel bei Zulage von Ammonacetat mit und ohne Rohfaserbeigabe zu einem Grundfutter.

Als Versuchstier nahm ich eine ausgewachsene Foxterrierhündin 6, die schon mehrfach zu Versuchen gedient hatte.

Zunächst wurde dem Tiere wieder ein Grundfutter, diesmal mit relativ wenig Calorien und Stickstoff, gegeben. Darauf wurden in zwei getrennten Perioden erst 1 g, dann 2 g Ammonacetat-N zugelegt. Da ich zum Vergleich in der VI. Periode an Stelle von Ammonacetat Blutalbumin verfütterte, der Caloriengehalt des Futters aber in allen Perioden, in denen Zulagen gegeben wurden, gleich sein sollte, legte ich in den Ammonacetatperioden noch so viel Fett zu, daß die Caloriengaben denen der Blutalbuminperiode entsprachen. Sämtliche Perioden sind durch zwischengeschaltete Grundfutterperioden getrennt.

Dann wurde das Grundfutter mit einer Zulage von Rohfaser (Strohmehl) gereicht, dem in der folgenden Periode wieder 1 g Ammonacetat-N beigegeben wurde. Zur Erkennung einer Nachwirkung wurde schließlich wieder das Grundfutter mit Strohpulver gegeben.

Als Rohfaser gab ich staubfein gemahlenes Stroh. Das zu Häcksel zerschnittene Stroh wurde im Dampftrockenschrank getrocknet und in der Kugelmühle ca. 24 Stunden lang zu feinem Staub zermahlen, der durch Absieben von ev. noch vorhandenen gröberen Teilen getrennt wurde. Um die Extraktstoffe, überhaupt alles in Wasser Lösliche zu entfernen (ich fürchtete, daß diese die Freßlust des Tieres beeinträchtigen könnten), verrührte ich das Strohmehl mit viel Wasser und zentrifugierte darauf den Mehlschlamm wieder ab, der an der Luft schnell trocknete und in einer Reibschale leicht fein zerrieben werden konnte. Es war ein geruch- und geschmackloses, staubfeines gelbes Pulver.

Die Analyse der Futterstoffe ergab folgenden N- und Caloriengehalt:

Pferdefleisch	3,24 % N	1,600 Cal.
Reis	1,23 „ „	3,798 „
Schmalz	— „ „	9,622 „
Knochen	5,32 „ „	1,805 „
Strohmehl	0,45 „ „	nicht bestimmt
Ammonacetat	—[1] „ „	3,721 Cal.
Blutalbumin	11,68 „ „	4,791 „

Das Grundfutter war folgendermaßen zusammengesetzt:

I. Periode. Grundfutter.

50 g Pferdefleisch	1,62 g N	80,00 Cal.
50 „ Reis	0,62 „ „	189,90 „
20 „ Schmalz	— „ „	192,44 „
2 „ Salz	— „ „	— „
1,66 „ Knochen	0,09 „ „	3,00 „
	2,33 g N	465,34 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,32 „ N	63 „

Tabelle VIII.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
17.—18. VII.	2,33	3,37	0,41	3,78	— 1,45	7,66	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
18.—19. „	2,33	3,29	0,41	3,70	— 1,37	7,68	
19.—20. „	2,33	3,24	0,41	3,65	— 1,32	7,60	
20.—21. „	2,33	3,32	0,41	3,73	— 1,40	7,57	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
21.—22. „	2,33	3,23	0,41	3,64	— 1,31	7,52	
22.—23. „	2,33	} 3,09	0,41	} 3,50	— 1,17	7,49	Hat einen Teil des Futters in den Käfig erbrochen. Erbrochenes mit dem Futter vom 23./24. wieder gegeben.
23.—24. „	2,33		0,41			7,44	
24.—25. VII.	2,33	2,78	0,41	3,19	— 0,86	7,42	
25.—26. „	2,33	2,92	0,41	3,33	— 1,00	7,37	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
26.—27. „	2,33	2,84	0,41	3,25	— 0,92	7,31	
27.—28. „	2,33	2,66	0,41	3,07	— 0,74	7,27	
28.—29. „	2,33	2,81	0,41	3,22	— 0,89	7,30	10 g Knochen gegeben.
Mittel von		33,55		38,06	—12,43	89,63	
12 Tagen	2,33	3,05	0,41	3,46	— 1,13	7,47	
Mittel aus den letzten 5 Tagen (24./25.—28./29.).							
Mittel von		14,01		16,06	— 4,41	36,67	
5 Tagen	2,33	2,80	0,41	3,21	— 0,88	7,33	

[1]) N-Gehalt nicht angegeben, da er während des Versuches sich veränderte. Vor jeder Ammonacetatperiode wurde der N-Gehalt des feuchten Salzes bestimmt.

Ziehe ich die N-Bilanz nur aus den letzten 5 Tagen der Periode (wie schon früher erwähnt, berücksichtige ich nur die letzten 5 Tage deshalb, weil das Mittel aus diesen mit den Mittelzahlen der späteren 5tägigen Perioden besser vergleichbar ist), so ergibt sich ein Minus von 0,88 g N pro Tag. Das Tier hat sich also mit 0,32 g N und 63 Cal. pro 1 kg Lebendgewicht nicht ins N-Gleichgewicht zu setzen vermocht, sondern im Gegenteil Stickstoff verloren. Entsprechend ist auch das Lebendgewicht gesunken. Das Tier hat während der 12tägigen Vorperiode 360 g an Gewicht eingebüßt.

Nun bekam die Hündin 1 g Ammonacetat-N dem Grundfutter beigemischt.

II. Periode.

Grundfutter	2,35 g N	465,95 Cal.
5,32 g Ammonacetat	1,00 „ „	19,78 „
	3,35 g N	485,73 Cal.
2,208 g Schmalz	— „ „	21,24 „
	3,35 g N	506,97 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,47 „ „	71 „

Tabelle IX.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
29.—30. VII.	3,35	3,48	0,46	3,94	— 0,59	7,26	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
30.—31. „	3,35	3,73	0,46	4,19	— 0,84	7,17	
31.VII.—1.VIII.	3,35	3,38	0,46	3,84	— 0,49	7,18	
1.—2. VIII.	3,35	3,44	0,46	3,90	— 0,55	7,17	
2.—3. „	3,35	3,26	0,46	3,72	— 0,37	7,16	
		17,29			— 2,84	35,94	
Mittel pro Tag	3,35	3,46	0,46	3,92	— 0,57	7,19	

Mit dem Ammonacetat bekam die Hündin noch eine kleine Schmalzzulage, um die Caloriengabe in dieser Periode mit der der VI. Periode, in der 1 g N als Blutalbumin gegeben wurde, vergleichbar zu machen.

Die N-Bilanz läßt eine deutliche Einwirkung des Ammonacetats erkennen. Von — 0,88 g N hat sich der N-Verlust auf — 0,57 g N verringert. Das Lebendgewicht ist bis auf 7,16 kg gesunken. In den letzten 4 Tagen ist es fast konstant geblieben.

Zur Erkennung der Nachwirkung gab ich zunächst wieder das Grundfutter.

III. Periode.

Grundfutter	2,35 g N	465,95 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,33 „ „	66 „

Tabelle X.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
3.—4. VIII.	2,35	2,55	0,42	2,97	— 0,62	7,15	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
4.—5. „	2,35	2,67	0,42	3,09	— 0,74	7,14	
5.—6. „	2,35	2,64	0,42	3,06	— 0,71	7,10	
6.—7. „	2,35	2,60	0,42	3,02	— 0,67	7,11	
7.—8. „	2,35	2,38	0,42	2,80	— 0,45	7,07	
		12,84			— 3,19	35,57	
Mittel pro Tag	2,35	2,57	0,42	2,99	— 0,64	7,11	

Eine Nachwirkung auf den 1. Tag der vorhergegangenen reicheren Stickstoffgaben läßt sich nicht erkennen. Im Mittel hat das Tier 2,57 g N pro Tag im Harn ausgeschieden. Im Vergleich mit der I. Grundfutterperiode hat die Hündin den N-Umsatz um 0,23 g eingeschränkt. Die N-Bilanz ergibt —0,64 g, also nur 0,07 g N mehr als die Bilanz der Ammonacetatperiode. Aus den Harn-N-Zahlen im Vergleich mit der I. Periode ist erkennbar, daß das Tier bestrebt ist, seinen N-Umsatz einzuschränken. Das Lebendgewicht hat sich wieder etwas verringert; das Tier wiegt nur noch 7,07 kg.

Die durch die Ammonacetatgaben herbeigeführte Einschränkung des Stickstoffumsatzes veranlaßte mich in der folgenden IV. Periode, dem Tiere abermals das Salz, diesmal aber in doppelter Dosis, dem Futter zuzulegen, um die N-Verluste im Harn weiter herabzusetzen, ev. sogar Stickstoffgleichgewicht zu erreichen.

IV. Periode.

Grundfutter	2,35 g N	465,95 Cal.
10,63 g Ammonacetat	2,00 „ „	39,56 „
	4,35 g N	505,51 Cal.
4,42 g Schmalz	— „ „	42,48 „
	4,35 g N	547,99 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,62 „ „	78 „

In dieser Periode bekam also die Hündin die doppelte Zulage in Ammonacetat und Schmalz wie in der II. Periode.

Tabelle XI.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
8.—9. VIII.	4,35	4,11	0,39	4,50	— 0,15	7,03	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
9.—10. „	4,35	4,10	0,39	4,49	— 0,14	7,00	
10.—11. „	4,35	4,40	0,39	4,79	— 0,44	7,05	Etwas Futter erbroch., aber bald wieder gefressen.
11.—12. „	4,35	4,23	0,39	4,62	— 0,27	7,02	
12.—13. „	4,35	4,31	0,39	4,70	— 0,35	7,02	
		21,15		23,10	— 1,35	35,12	
Mittel pro Tag	4,35	4,23	0,39	4,62	— 0,27	7,02	

Das Tier verliert, wie die N-Bilanz zeigt, nur noch 0,27 g N vom Körper. Das N-Gleichgewicht ist zwar nicht erreicht worden, aber an den beiden ersten Tagen der Periode sind die N-Verluste so gering, daß man praktisch von einem N-Gleichgewicht wohl sprechen kann. Im Vergleich mit der vorhergehenden Grundfutterperiode hat die Hündin den N-Umsatz um 0,34 g verringert. Die N-Bilanz ist von — 0,64 g in Periode III auf — 0,27 g gesunken, woraus sich eine Einschränkung des N-Umsatzes von 0,37 g berechnet. Das Lebendgewicht beträgt nur noch 7,02 kg im Mittel der Periode; es hat sich fast konstant in den 5 Tagen gehalten, ist aber gegen Periode III im Mittel um 90 g verringert.

Zur Erkennung der Nachwirkung gab ich wieder das Grundfutter.

V. Periode.

Grundfutter . . . . 2,35 g N 465,95 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . . 0,34 „ „ 67 „

Tabelle XII.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
13.—14. VIII.	2,35	2,88	0,43	3,31	— 0,96	7,05	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
14.—15. „	2,35	2,56	0,43	2,99	— 0,64	6,97	
15.—16. „	2,35	2,56	0,43	2,99	— 0,64	7,01	
16.—17. „	2,35	2,43	0,43	2,86	— 0,51	6,97	
17.—18. „	2,35	2,42	0,43	2,85	— 0,50	6,92	
		12,85		15,00	— 3,25	34,92	
Mittel pro Tag	2,35	2,57	0,43	3,00	— 0,65	6,98	

Vergleicht man die täglichen N-Bilanzen, so ergibt sich am ersten Tage ein bedeutend höherer Wert, der wohl der vorangegangenen Ammonacetatfütterung zur Last zu legen ist. Im Mittel entspricht die N-Bilanz der der III. Periode. Das Lebendgewicht ist weiter bis auf 6,92 kg gesunken.

In der wieder anschließenden VI. Periode bekam die Hündin Blutalbumin, entsprechend 1 g N, zugelegt.

VI. Periode.

Grundfutter	2,35 g N	465,95 Cal.
8,562 g Blutalbumin	1,00 „ „	41,02 „
	3,35 g N	506,97 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,49 „ „	74 „

Tabelle XIII.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
18.—19. VIII.	3,35	3,14	0,45	3,59	— 0,24	6,90	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
19.—20. „	3,35	3,50	0,45	3,95	— 0,60	6,88	
20.—21. „	3,35	3,55	0,45	4,00	— 0,65	6,86	
21.—22. „	3,35	3,53	0,45	3,98	— 0,63	6,83	
22.—23. „	3,35	3,36	0,45	3,81	— 0,46	6,83	Kot nicht abgesetzt v. d. Wägung.
		17,08			2,58	34,30	
Mittel pro Tag	3,35	3,42	0,45	3,87	— 0,52	6,86	

Der Einfluß der Albumingabe ist gering. Von — 0,65 g (Periode V) ist die N-Bilanz auf — 0,52 g gesunken. Mithin läßt sich nur eine Einschränkung des N-Umsatzes von 0,13 g konstatieren. Jedenfalls ist die Wirkung von 1 g Albumin-N, nach der N-Bilanz beurteilt, wesentlich geringer als die von 2 g Ammonacetat-N mit einer kleinen Zulage von 4 g Schmalz mit ca. 40 Cal. In den 5 Tagen der Periode hat das Tier 90 g an Gewicht verloren.

Anschließend bekam das Tier wieder das Grundfutter.

VII. Periode.

Grundfutter	2,35 g N	465,95 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,35 „ „	69 „

Tabelle XIV.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
23.—24. VIII.	2,35	3,06	0,45	3,51	— 1,16	6,88	**10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.**
24.—25. „	2,35	2,77	0,45	3,22	— 0,87	6,82	
25.—26. „	2,35	2,54	0,45	2,99	— 0,64	6,74	
26.—27. „	2,35	2,70	0,45	3,15	— 0,80	6,71	
27.—28. „	2,35	2,71	0,45	3,16	— 0,81	6,67	
		13,78		16,03	4,28	33,82	
Mittel pro Tag	2,35	2,76	0,45	3,21	— 0,86	6,76	

Auffällig hoch ist die N-Ausscheidung im Harn am 1. Tage. Im Vergleich mit den Grundfutterperioden III und V zeigt sich ein Ansteigen des Stickstoffgehaltes des Harns. Diese Erhöhung des N-Umsatzes kann unmöglich auf eine ungünstige Einwirkung der Albumingabe in der VI. Periode zurückgeführt werden. Es gewinnt hiernach den Anschein, daß durch die für den Organismus zweifellos anormal zu nennende Ernährung mit Ammonacetat eine Empfindlichkeit erzeugt worden ist, die bei nachheriger belangreicher Albuminzufuhr zu N-Verlusten vom Körper geführt hat. Vielleicht ist die geringe Wirkung der Albumingabe in der vorhergehenden Periode in gleicher Weise zu verstehen.

In den nun folgenden drei Perioden erhielt die Hündin zum Grundfutter eine Zulage von 50 g Strohmehl.

VIII. Periode.

Grundfutter	2,35 g N	465,95 Cal.
50 g Strohmehl	0,23 „ „	nicht berücksichtigt
	2,58 g N	465,95 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . .	0,39 „ „	70 „

Tabelle XV.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
28.—29. VIII.	2,58	2,97	0,86	3,83	— 1,25	6,65	**6 g Knochen z. Kotabgrenzung gegeben.**
29.—30. „	2,58	2,62	0,86	3,48	— 0,92	6,63	
30.—31. „	2,58	2,60	0,86	3,46	— 0,90	6,61	
31. VIII.—1. IX.	2,58	2,63	0,86	3,49	— 0,93	6,62	
1.—2. IX.	2,58	2,55	0,86	3,41	— 0,85	6,57	**4 g Knochen gegeben.**
		13,37			4,85	33,08	
Mittel pro Tag	2,58	2,67	0,86	3,53	— 0,95	6,62	

Die bedeutende Zunahme des Kot-Stickstoffs ist durch die Rohfaserbeigabe, durch die das Volumen des Futters wesentlich vergrößert wurde, erklärlich (Darmschleim). Die im Stroh enthaltenen 0,23 g N sind wohl vollständig wieder im Kot ausgeschieden worden. Bringe ich diese in Abzug, so wären für Kot-N nur noch 0,63 g täglich in Rechnung zu setzen. Die gegenüber Periode VII jetzt noch mehr vorhandenen 0,18 g N sind wohl ausschließlich der Mehrausscheidung von Verdauungssekreten zur Last zu legen, denn aus den Harn-N-Zahlen läßt sich auf eine schlechtere Verdaulichkeit des Futters nicht schließen. Der N-Umsatz ist im wesentlichen der gleiche geblieben (pro Tag im Mittel 2,67 g Harn-N gegenüber 2,76 g in Periode VII). Die N-Bilanz ist natürlich auf Kosten des erhöhten Kot-N auf — 0,95 g gefallen. Die Calorien des Strohmehles habe ich nicht berücksichtigt, weil sie für den Fleischfresser, für den die Rohfaser lediglich als Ballast zu betrachten ist, unverwertbar sind. Das Lebendgewicht beträgt nur noch 6,62 kg im Mittel der Periode.

Dem Grundfutter mit Strohmehl wurde jetzt Ammonacetat (1 g N) zugelegt.

IX. Periode.

Grundfutter + 50 g Strohmehl . . .	2,58 g N	465,95 Cal.
5,32 g Ammonacetat	1,00 „ „	19,78 „
2,208 g Schmalz	— „ „	21,24 „
	3,58 g N	506,97 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,55 „ „	78 „

Tabelle XVI.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
2.—3. IX.	3,58	3,51	0,80	4,31	— 0,73	6,54	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
3.—4. „	3,58	3,53	0,80	4,33	— 0,75	6,52	
4.—5. „	3,58	3,34	0,80	4,14	— 0,56	6,50	
5.—6. „	3,58	3,42	0,80	4,22	— 0,64	6,46	
6.—7. „	3,58	3,41	0,80	4,21	— 0,63	6,45	
		17,21		21,21	3,31	32,47	
Mittel pro Tag	3,58	3,44	0,80	4,24	— 0,66	6,49	

Die stickstoffeinschränkende Wirkung des essigsauren Ammoniaks ist wieder deutlich erkennbar. Die N-Bilanz zeigt im

Vergleich mit Periode VIII eine Herabsetzung des N-Umsatzes von 0,29 g. Eine bessere Wirkung des Acetates durch die Rohfaserbeigabe ist nicht zu bemerken. Denn während hier von dem 1 g Ammonacetat-N 0,77 g wieder im Harn zur Ausscheidung kamen, sind in Periode II, wo das Salz ohne Rohfaserbeigabe verfüttert wurde, nur 0,66 g N im Harn wieder erschienen. Die Hündin hat weiter an Gewicht abgenommen. Das Lebendgewicht beträgt nur noch 6,45 kg.

Zur Erkennung einer ev. Nachwirkung bekam das Tier wieder das Grundfutter.

X. Periode.

Grundfutter + 50 g Strohmehl . . .	2,58 g N	465,95 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,41 „ „	73 „

Tabelle XVII.

1911	N-Einnahme	N-Ausgabe im			N am Körper	Leb.-Gew.	Bemerkungen
		Harn	Kot	zus.			
	g	g	g	g	g	kg	
7.—8. IX.	2,58	2,93	0,87	3,80	— 1,22	6,43	10 g Knochen zur Kotabgrenzung gegeben.
8.—9. „	2,58	2,61	0,87	3,48	— 0,90	6,41	
9.—10. „	2,58	2,56	0,87	3,43	— 0,85	6,38	
10.—11. „	2,58	2,61	0,87	3,48	— 0,90	6,35	
11.—12. „	2,58	—	0,87	—	—	6,32	
		10,71		14,19		31,89	
Mittel pro Tag	2,58	2,68	0,87	3,55	— 0,97	6,38	

Die hohe N-Ausscheidung im Harn am 1. Tage ist auf die Acetatgaben der vorhergehenden Periode zurückzuführen. Die N-Bilanz entspricht mit — 0,97 g der der VIII. Periode (— 0,95 g). Am Schlusse dieses Versuches wiegt die Hündin nur noch 6,38 kg. Das Tier hat also während des ganzen Versuches (7,66 — 6,32) 1,34 kg seines Lebendgewichtes eingebüßt.

Als Resultat des 3. Versuches ergibt sich, daß essigsaures Ammoniak auch bei geringeren Caloriengaben den N-Umsatz des Fleischfressers beträchtlich herabzusetzen vermag. Durch weitere Gaben des Salzes in doppelter Menge konnten die N-Verluste noch mehr herabgedrückt werden (von — 0,88 g N auf — 0,27 g N); das Tier näherte sich also dem N-Gleichgewicht. Außer dieser günstigen Wirkung macht sich in den anschließenden Perioden eine für den N-Bestand des Körpers schädigende

Nachwirkung bemerkbar. Albumin vermochte nur eine minimale Wirkung zu äußern, und in den folgenden Grundfutterperioden steigt der N-Umsatz sofort wieder zu der in Periode I beobachteten Höhe an. Wie schon erwähnt, scheint eine Empfindlichkeit des Organismus durch die anormale N-Fütterung verursacht worden zu sein, die bei nachheriger normaler N-Ernährung sich in einer Erhöhung des N-Umsatzes äußert.

Eine bessere Verwertung des Ammonacetats durch Zugabe zu einem durch relativ viel Rohfaser voluminöser gemachten Futter war nicht zu bemerken.

Der ungünstige Einfluß, den Ammoniumtartrat in einem früheren Versuche ausgeübt hatte (Morgen und seine Mitarbeiter hatten gleichfalls bei Versuchen an Herbivoren gefunden, daß das Tartrat dem Acetat in seiner Wirkung bedeutend nachsteht), des ferneren die weniger günstige Einwirkung des Ammoniumlactats auf den Stickstoffumsatz schien mir darauf hinzudeuten, daß vielleicht doch die Essigsäure bei den mit Ammonacetat beobachteten Einschränkungen des Stickstoffumsatzes eine wesentliche Rolle spielen könnte.

Die Frage, welche Bedeutung einerseits der Essigsäure und andererseits dem Ammoniak zukommt, veranlaßte mich, an Stelle der fertigen Verbindung die zur Bildung von essigsaurem Ammoniak nötigen Salze einzeln und schließlich ein Gemisch zu verfüttern. Ich beabsichtigte, zunächst essigsaures Natron zu geben, dann Ammoniumchlorid für sich und schließlich beide Salze zusammen zu reichen. Auf diese Weise ließ sich zwar mit Sicherheit nicht die Bedeutung der Essigsäure und ebensowenig die des Ammoniaks feststellen, denn es blieb so noch die Frage offen, welche Rolle dem an die Essigsäure gebundenen Natron resp. dem Chlor des Chlorammoniums zukommt. Es mußte sich aber bei Gabe des Gemisches beider Salze (ich gab diese in den zur Bildung von $NaCl + CH_3.COONH_4$ notwendigen Mengen) zeigen, ob bei Gegenwart von Chlorammonium essigsaures Natron oder umgekehrt Chlorammonium bei Gegenwart von essigsaurem Natron den Stickstoffumsatz zu beeinflussen vermag.

Das Resultat dieses Versuches ließ sich bis zum gewissen Grade voraussehen. Chlorammonium hatte bei allen Versuchen (Grafe und Schlaepfer l. c. haben neuerdings mit diesem Salze

N-Retentionen erzielt), die seinerzeit vorlagen, nie eine N-einschränkende Wirkung erkennen lassen. Es war also vorauszusehen, daß der gesamte Stickstoff des Salmiaks wieder im Harn zum Vorschein kommen würde. Vom essigsauren Natron ist bekannt, daß es als harntreibendes Mittel in der Medizin Verwendung findet. Salkowski und Munk hatten beim Hunde nach Natriumacetatgaben Diurese und damit verbunden eine mäßige Steigerung des Eiweißzerfalles konstatiert. Das gleiche Ergebnis fand Weiske bei Fütterungsversuchen mit Hammeln. Es war also beim essigsauren Natron eine diuretische Wirkung mit einem mehr oder weniger großen Stickstoffverlust vom Körper zu erwarten. Fraglich blieb eigentlich nur die Wirkung des Gemisches beider Salze.

Im voraus bemerke ich, daß es mir nicht gelang, den Tieren das Chlorammonium beizubringen. Die Hunde verweigerten das Futter. Dafür aber konnte ich mit essigsaurem Natron eine Periode durchführen.

4. Versuch
Stickstoffwechsel bei Zulage von Natriumacetat zu einem Grundfutter.

Als Versuchstier diente wieder die Foxterrierhündin 6, die sich durch ihre große Freßlust schon bei mehreren früheren Versuchen als besonders geeignetes Versuchstier erwiesen hatte.

Die Futterstoffe hatten folgenden N- und Caloriengehalt:

Pferdefleisch	3,24 % N	1,600 Cal.
Reis	1,33 „ „	3,759 „
Schmalz	— „ „	9,622 „
Natriumacetat	— „ „	—[1]) „

I. Periode. Grundfutter.

Das Grundfutter hatte folgende Zusammensetzung:

80 g Pferdefleisch	2,59 g N	128,00 Cal.
80 „ Reis	1,06 „ „	300,72 „
60 „ Schmalz	— „ „	577,32 „
2 „ Kochsalz	— „ „	— „
	3,65 g N	1006,04 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,49 „ „	134 „

[1]) Die Calorien sind berechnet auf die an Natrium gebundene Essigsäure. 1 g Essigsäure = 3,49 Cal.

Tabelle XVIII.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
1.—2. XI.	3,65	3,49	0,63	4,12	— 0,47	7,49	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
2.—3. „	3,65	3,05	0,63	3,68	— 0,03	7,52	
3.—4. „	3,65	3,21	0,63	3,84	— 0,19	7,52	
4.—5. „	3,65	3,01	0,63	3,64	+ 0,01	7,49	
5.—6. „	3,65	3,04	0,63	3,67	— 0,02	7,60	Kot nicht abgesetzt vor der Wägung.
		15,80		18,95		37,62	
Mittel pro Tag	3,65	3,16	0,63	3,79	— 0,14	7,52	

Mittel aus den letzten 4 Tagen (2./3. bis 5./6.).

Mittel von		12,31		14,83		30,13	
4 Tagen...	3,65	3,08	0,63	3,71	— 0,06	7,53	

Nach längerer Vorfütterung gelang es mir, die Hündin ins Stickstoffgleichgewicht zu bringen. Auffällig ist die bedeutende Energiemenge, die die Hündin beansprucht, um ins Stickstoffgleichgewicht zu kommen. Pro kg Lebendgewicht gebraucht das Tier bei 0,49 g N noch 134 Cal.

Am 1. November begann der Versuch.

Wie aus Tabelle XVIII ersichtlich, befindet sich die Hündin ungefähr im N-Gleichgewicht, wenn ich das Mittel pro Tag aus den letzten 4 Tagen der Periode berechne. Der 1. Tag zeigt eine wesentlich höhere N-Ausscheidung im Harn als die folgenden 4 Tage, weshalb er bei Berechnung der täglichen N-Bilanz besser fortgelassen wird. Das Tier hat sich ungefähr auf seinem Lebendgewicht erhalten. Die höhere Zahl am letzten Tage erklärt sich aus der Bemerkung in der Tabelle.

In der nun anschließenden II. Periode legte ich dem Grundfutter 9,612 g essigsaures Natron zu. Ich habe diese Gabe so berechnet, daß die Tiere im Natriumacetat dieselbe Menge Essigsäure erhielten wie bei Verabreichung von Ammonacetat, entsprechend 1 g N. Auf diese Weise läßt der Versuch vielleicht einen Vergleich mit den Ammonacetatversuchen zu.

II. Periode.

Grundfutter	3,65 g N	1006,04 Cal.
9,612 g Natriumacetat . . .	— „ „	14,90 „
	3,65 g N	1020,94 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,48 „ „	135 „

Tabelle XIX.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	N-Ausgabe im Kot g	N-Ausgabe im zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
6.—7. XI.	3,65	2,98	0,61	3,59	+ 0,06	7,49	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
7.—8. „	3,65	2,82	0,61	3,43	+ 0,22	7,47	
8.—9. „	3,65	2,72	0,61	3,33	+ 0,32	7,52	
9.—10. „	3,65	2,87	0,61	3,48	+ 0,17	7,61	
10.—11. „	3,65	2,99	0,31	3,60	+ 0,05	7,66	
		14,38		17,43	0,82	37,75	
Mittel pro Tag	3,65	2,88	0,61	3,49	+ 0,16	7,55	

Wie man in Verfolg der N-Zahlen für Harn deutlich erkennen kann, hat das Natriumacetat eine beachtenswerte Einschränkung des Stickstoffumsatzes herbeizuführen vermocht. Die N-Bilanz läßt im Mittel pro Tag eine Retention von 0,22 g erkennen. Es zeigt sich also, entgegen den Beobachtungen von Salkowski und Munk, keine Erhöhung des Eiweißzerfalles, sondern im Gegenteil eine Stickstoffretention. Neben dieser günstigen Wirkung war eine kräftige Diurese zu beobachten. Die Harnmenge war im Vergleich mit der vorhergehenden Grundfutterperiode ungefähr um das Dreifache vermehrt. Die vermehrte Abgabe von Flüssigkeit bewirkte, daß die Hündin, die sonst nie Wasser annahm, jetzt täglich mehrfach größere Mengen aufnahm. Das Lebendgewicht ist weiter angestiegen von 7,49 kg auf 7,65 kg.

Um die Nachwirkung zu erkennen, bekam die Hündin nun wieder das Grundfutter.

III. Periode.

Grundfutter . . . . 3,65 g N 1006,04 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . . 0,47 „ „ 129 „

Tabelle XX.

1911	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	N-Ausgabe im Kot g	N-Ausgabe im zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
11.—12. XI.	3,65	3,23	0,67	3,90	— 0,25	7,72	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
12.—13. „	3,65	3,02	0,67	3,69	— 0,04	7,82	
13.—14. „	3,65	3,12	0,67	3,79	— 0,14	7,79	
14.—15. „	3,65	3,13	0,67	3,80	— 0,15	7,80	
15.—16. „	3,65	3,09	0,67	3,76	— 0,11	7,78	
		15,59			0,69	38,91	
Mittel pro Tag	3,65	3,12	0,67	3,79	— 0,14	7,78	

Der 1. Tag zeigt eine höhere N-Ausscheidung im Harn, die als Nachwirkung der vorhergegangenen Natriumacetatfütterung zu betrachten ist. Die folgenden Tage entsprechen ungefähr denen der ersten Periode (vgl. Tabelle XVIII). Die geringe Erhöhung des Kot-Stickstoffes (0,06 g) gestattet keine weiteren Schlüsse. Die N-Bilanz ist wieder negativ geworden (— 0,14 g).

Das wesentliche Ergebnis dieses Versuches ist die stickstoffeinschränkende Wirkung von essigsaurem Natron. Wie schon erwähnt, waren Salkowski und Munk[1]) gerade zu dem entgegengesetzten Resultate gelangt. Rost[2]) hat festgestellt, daß bei einer durch Salzgaben hervorgerufenen Diurese eine Steigerung des Eiweißumsatzes nur dann eintritt, wenn nicht genügend Wasser gereicht wird, um die Mehrabgabe von Flüssigkeit zu kompensieren, daß aber bei ausreichender Wasserzufuhr der Eiweißumsatz eingeschränkt wird. Letzteres habe ich im vorhergehenden Versuche bestätigt gefunden, denn ich habe dem Tiere so viel Wasser gegeben als es gebrauchte. Ich möchte hierbei bemerken, daß ich in allen Versuchen meinen Tieren täglich stets Wasser angeboten habe, das Bedürfnis nach Flüssigkeitsaufnahme also stets befriedigt habe.

Diese von mir mit Natriumacetat gefundenen Zahlen bedurften natürlich einer Nachprüfung. Leider gelang es mir bisher nicht, mit einem anderen Tiere einen einwandfreien Versuch durchzuführen. Eine Hündin (10) verweigerte schon am 2. Tage der Natriumacetatperiode das Futter. Erwähnen möchte ich aber, daß diese Hündin, die in der Vorperiode, wo sie das Grundfutter erhielt, 3,26 g N im Mittel pro Tag im Harn ausschied, am folgenden Tage nach Gabe von 9,612 g Natriumacetat zum Grundfutter nur 2,80 g N im Harn ausschied. Für diesen einen Tag läßt sich jedenfalls eine beträchtliche Einschränkung des N-Umsatzes konstatieren.

An dieser Stelle möchte ich bemerken, daß ich weitere Zahlen, die die N-einschränkende Wirkung des Natriumacetats dartun, neuerdings gefunden habe. Ich sehe aber, da ich meine Versuche noch nicht abgeschlossen habe, von einer Mitteilung heute ab.

---

[1]) Virchows Archiv 71, 500, 1877.

[2]) Arbeiten d. Kais. Gesundheitsamts 18, 78, 1901.

Daß bei der beobachteten Wirkung von essigsaurem Natron das Natrium im wesentlichen in Betracht kommen könnte, schien mir nicht wahrscheinlich. Dagegen würde verschiedenes sprechen; z. B. hat Voit gefunden, daß Kochsalzzufuhr die Stickstoffausfuhr steigert. Um nun erkennen zu können, ob vielleicht die Essigsäure hauptsächlich die günstige N-Bilanz verursacht hat, gab ich im folgenden Versuche einer Hündin ein Gemisch von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumacetat. Ich wählte ein Gemisch dieser Salze, weil sie einmal z. T. zueinander ein antagonistisches Verhalten zeigen (Ca ⇆ Na) und weil sie ferner in den Geweben der Tiere vorkommen. Ich hoffte, durch dieses Gemisch die spezifische Wirkung des einzelnen Salzes nach Möglichkeit abzuschwächen und so einen ev. Einfluß der Essigsäure auf den Stickstoffumsatz deutlicher erkennen zu können.

5. Versuch.

Stickstoffwechsel bei Zulage eines Gemisches von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumacetat zu einem Grundfutter.

Zu diesem Versuche nahm ich eine größere, rasselose Hündin 5, die ebenso wie Hündin 6 schon mehrfach zu Versuchen gedient hatte.

Die Analyse der Futterstoffe ergab an N- und Caloriengehalt für:

Pferdefleisch	3,43 % N	1,663 Cal.
Reis	1,33 „ „	3,759 „
Schmalz	— „ „	9,670 „

Nach längerer Vorfütterung begann ich am 13. Januar 1912 den Versuch.

I. Periode. Grundfutter.

80 g Pferdefleisch	2,74 g N	133,04 Cal.
80 „ Reis	1,06 „ „	300,72 „
20 „ Schmalz	— „ „	193,40 „
2 „ Kochsalz	— „ „	— „
	3,80 g N	627,16 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,40 „ „	66 „

Aus dem N-Gehalt des Harns der einzelnen Tage erkennt man die Tendenz des Tieres, ins N-Gleichgewicht zu kommen. Die N-Bilanz ergibt im Mittel dieser 7 tägigen Periode + 0,03 g. Auffallend ist, wieviel weniger Calorien dieses Tier im Vergleich

Tabelle XXI.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
13.—14. I.	3,80	3,33	0,27	3,60	+ 0,20	9,52	Kot nicht abges. Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
14.—15. „	3,80	3,30	0,27	3,57	+ 0,23	9,48	
15.—16. „	3,80	3,51	0,27	3,78	+ 0,02	9,49	
16.—17. „	3,80	3,40	0,27	3,67	+ 0,13	9,46	Kot nicht abgesetzt.
17.—18. „	3,80	3,63	0,27	3,90	— 0,10	9,43	Kot nicht abgesetzt. Im Käfig wenig Kot.
18.—19. „	3,80	3,53	0,27	3,80	± 0,00	9,42	Kot nicht abgesetzt.
19.—20. „	3,80	3,78	0,27	4,05	— 0,25	9,42	
		24,48		26,37		66,22	
Mittel pro Tag	3,80	3,50	0,27	3,77	+ 0,03	9,46	

mit der Hündin 6 im vorhergehenden Versuche gebraucht. Mit 0,40 g N und 66 Cal. pro 1 kg Lebendgewicht kommt Hündin 5 (Lebendgewicht 9,4 kg) ins N-Gleichgewicht, während Hündin 6 (Lebendgewicht 7,5 kg) pro 1 kg Lebendgewicht bei 0,49 g N noch 134 Cal. brauchte, und selbst dann noch zeigte die N-Bilanz ein kleines Minus.

In der II. Periode setzte ich dem Grundfutter 25 ccm einer Lösung zu, die 3,06 g Essigsäure in Form von Acetaten enthielt.

II. Periode.

Grundfutter	3,80 g N	627,16 Cal.
25 ccm Salzlösung (3,06 g Essigsäure)	— „ „	10,68 „
	3,80 g N	637,84 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,41 „ „	68 „

Tabelle XXII.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
20.—21. I.	3,80	3,64	0,28	3,92	— 0,12	9,37	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
21.—22. „	3,80	3,70	0,28	3,98	— 0,18	9,38	
22.—23. „	3,80	3,71	0,28	3,99	— 0,19	9,35	Kot n. abges. Abgrenzung im Käfig gefunden.
23.—24. „	3,80	3,46	0,28	3,74	+ 0,06	9,32	
24.—25. „	3,80	3,63	0,28	3,91	— 0,11	9,38	
		18,14		19,54		46,80	
Mittel pro Tag	3,80	3,63	0,28	3,91	— 0,11	9,36	

Zunächst war eine diuretische Wirkung nicht zu beobachten. Das Tier nahm auch kein Wasser auf. Der Stickstoffumsatz ist im wesentlichen unverändert. Wenn auch die N-Bilanz gegenüber Periode I einen N-Verlust von 0,14 g ergibt, so zeigt sich doch, daß die Werte für Harn-N im Vergleich mit denen der vorhergehenden Grundfutterperiode bei nicht unbeträchtlichen Schwankungen sich in denselben Grenzen bewegen. Jedenfalls lassen die Schwankungen in den täglichen N-Ausscheidungen im Harn weder eine schlechte noch eine günstige Einwirkung des Salzgemisches erkennen.

Anschließend erhielt das Tier wieder das Grundfutter zur Feststellung einer ev. Nachwirkung.

III. Periode.

Grundfutter	3,80 g N	627,16 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,41 „ „	67 „

Tabelle XXIII.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
25.—26. I.	3,80	3,66	0,42	4,08	— 0,28	9,37	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
26.—27. „	3,80	3,49	0,42	3,91	— 0,11	9,38	
27.—28. „	3,80	3,37	0,42	3,79	+ 0,01	9,37	Kot nicht abgesetzt.
28.—29. „	3,80	3,36	0,42	3,78	+ 0,02	9,37	„ „ „
29.—30. „	3,80	3,63	0,42	4,05	— 0,25	9,35	
		17,51		19,61		46,84	
Mittel pro Tag	3,80	3,50	0,42	3,92	— 0,12	9,37	

Im Mittel pro Tag zeigt sich, daß der Stickstoffumsatz (N-Zahlen für Harn) dem der ersten Grundfutterperiode (Tabelle XXI) entspricht. Der Kot-Stickstoff ist um 0,14 g erhöht, anscheinend durch die Salzgaben in Periode II bewirkt.

Da ich in der II. Periode zunächst nur eine geringe Zulage von essigsauren Salzen gegeben hatte, legte ich nunmehr dem Grundfutrer die doppelte Menge zu.

IV. Periode.

Grundfutter	3,80 g N	627,16 Cal.
50 ccm Salzlösung (6,12 g Essigsäure)	— „ „	21,36 „
	3,80 g N	648,52 Cal.
Pro kg Lebendgewicht	0,41 „ „	69 „

Tabelle XXIV.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
30.—31. I.	3,80	3,43	0,28	3,71	+ 0,09	9,36	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
31. I.—1. II.	3,80	3,41	0,28	3,69	+ 0,11	9,38	
1.—2. „	3,80	3,46	0,28	3,74	+ 0,06	9,35	
		10,30		11,14		28,09	
Mittel pro Tag	3,80	3,43	0,28	3,71	+ 0,09	9,36	

Eine diuretische Wirkung ist auch diesmal nicht wahrnehmbar. Das Tier fraß das Futter spontan und nahm wie sonst kein Wasser an. Die Harn-N-Zahlen, im Mittel pro Tag 3,43 g N, lassen eine günstige Wirkung der Salzlösung auf den N-Umsatz in dieser nur 3 tägigen Periode nicht erkennen. Der N-Gehalt des Kotes zeigt wieder den in den Perioden I und II gefundenen Wert. Die N-Bilanz hat mit + 0,09 g N am Körper den in diesem Versuche beobachteten höchsten Wert. Ein sicherer Schluß auf eine Einwirkung der Salzzugabe ist aber bei den geringen Differenzen, die sich im Vergleich mit den anderen Perioden zeigen, und bei der nur 3 Tage währenden Dauer der Verabreichung nicht möglich.

V. Periode.

Grundfutter . . . . 3,80 g N 627,06 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . . 0,41 „ „ 67 „

Tabelle XXV.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
2.—3. II.	3,80	3,71	0,37	4,08	— 0,28	9,36	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
3.—4. „	3,80	3,77	0,37	4,14	— 0,34	9,35	
4.—5. „	3,80	3,55	0,37	3,92	— 0,12	9,30	
		11,03		12,14		28,01	
Mittel pro Tag	3,80	3,68	0,37	4,05	— 0,25	9,33	

In dieser, zur Erkennung einer Nachwirkung angeschlossenen Grundfutterperiode zeigt sich an den ersten beiden Tagen ein Ansteigen des N-Umsatzes. Beachtenswert ist, daß der Kot-Stickstoff wieder erhöht ist, gegen Periode II um 0,09 g. Aus

der N-Bilanz müßte auf eine durch die Salzgaben verursachte ungünstige Wirkung geschlossen werden. Da der Stickstoffwechsel aber nur während 3 Tagen beobachtet worden ist und sich abnorm hohe Zahlen nicht gezeigt haben (z. B. hat das Tier am letzten Tage der I. Periode 3,78 g N im Harn ausgeschieden, auch in der II. Periode finden sich unter den Harn-N-Zahlen Werte wie 3,70 g und 3,71 g), so läßt die im Mittel berechnete N-Bilanz mit — 0,25 g einen Schluß auf eine schädliche Nachwirkung nicht zu.

Dieser 5. Versuch läßt eine Einwirkung eines Gemisches von essigsauren Salzen auf den Stickstoffumsatz nicht mit Sicherheit erkennen. Die Erhöhung des Kot-Stickstoffs in den auf die Acetatgaben folgenden Grundfutterperioden läßt auf eine durch die Salze verursachte vermehrte Abscheidung von Verdauungssekreten schließen. Eine deutliche laxierende Wirkung war jedoch nicht wahrnehmbar. Eine Wiederholung dieses Versuches ist beabsichtigt.

Schließlich möchte ich heute noch einen 6. Versuch beschreiben, den ich anstellte, um die Wirkung von Calciumacetat zu prüfen. Bekanntlich wird Natrium im Harn ausgeschieden, während Calcium zum allergrößten Teile in den Exkrementen wieder erscheint. Des ferneren bewirkt essigsaures Natron eine lebhafte Diurese, was beim essigsauren Kalk nicht der Fall ist. Es schien mir deshalb von Bedeutung, den Einfluß von essigsaurem Kalk auf den Stickstoffwechsel zu studieren.

6. Versuch.

Stickstoffwechsel bei Zulage von Calciumacetat zu einem Grundfutter.

Zu diesem Versuche nahm ich wieder die Hündin 6.

N- und Caloriengehalt der Futterstoffe.

	N	Cal.
Pferdefleisch	3,24 % N	1,600 Cal.
Reis	1,33 „ „	3,759 „
Schmalz	— „ „	9,670 „
Calciumacetat	— „ „	—[1]) „

Das Tier bekam wie immer zunächst ein Grundfutter von folgender Zusammensetzung:

---

[1]) Die Calorien sind berechnet auf die an Calcium gebundene Essigsäure. 1 g Essigsäure = 3,49 Cal.

I. Periode. Grundfutter.

80 g Fleisch	2,59 g N	128,00 Cal.
80 „ Reis	1,06 „ „	300,72 „
60 „ Schmalz	— „ „	580,20 „
2 „ Salz	— „ „	— „
	3,65 g N	1008,92 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,46 „ „	127 „

Tabelle XXVI.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
11.—12. II.	3,65	3,00	0,55	3,55	+ 0,10	8,00	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt. Kot nicht abgesetzt v. d. Wägung.
12.—13. „	3,65	2,96	0,55	3,51	+ 0,14	7,93	
13.—14. „	3,65	3,15	0,55	3,70	— 0,05	7,99	
		9,11		10,76	0,19	23,92	
Mittel pro Tag	3,65	3,04	0,55	3,59	+ 0,06	7,97	

Die mittlere tägliche N-Bilanz läßt erkennen, daß sich die Hündin ungefähr im N-Gleichgewicht befindet.

Nun bekam das Tier zum Grundfutter 25 ccm einer Calciumacetatlösung, die 3,42 g Essigsäure enthielt.

II. Periode.

Grundfutter	3,65 g N	1008,92 Cal.
25 ccm Calciumacetatlösung (3,42 g Essigsäure) . . .	— „ „	11,93 „
	3,65 g N	1020,85 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,45 „ „	126 „

Tabelle XXVII.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im Harn g	Kot g	zus. g	N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
14.—15. II.	3,65	3,13	0,55	3,68	— 0,03	8,10	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt.
15.—16. „	3,65	3,14	0,55	3,69	— 0,04	8,10	Viel Kot abgesetzt.
16.—17. „	3,65	3,31	0,55	3,86	— 0,21	8,15	Weichen Kot abgesetzt.
		9,58		11,23	0,28	24,35	
Mittel pro Tag	3,65	3,19	0,55	3,74	— 0,09	8,12	

Eine diuretische Wirkung ist nicht vorhanden, ebensowenig eine stickstoffeinschränkende Wirkung des Calciumacetats. Im Gegenteil scheint, wie der N-Gehalt des Harns am 3. Tage erkennen läßt, eher eine den N-Umsatz schädigende Wirkung sich

zu äußern. Aus der täglichen mittleren Bilanz läßt sich bei der nur 3 tägigen Periode ein Minus von 0,15 g N vom Körper konstatieren. Äußerlich macht sich die Calciumwirkung deutlicher in dem weicheren Kot bemerkbar. Es war mir auch nicht möglich gewesen, den Kot dieser Periode für sich abzugrenzen, da sich die Kieselsäureabgrenzung in dem sehr dünnen Kot verwischt hatte. Die N-Zahlen für Kot in der I. und II. Periode stellen deshalb das Mittel aus allen 6 Tagen beider Perioden dar. Bei der Kürze der Perioden dieses orientierenden Versuches wird eine merkliche Erhöhung des Kot-Stickstoffs wohl kaum eingetreten sein.

Um die Nachwirkung zu erkennen, bekam die Hündin wieder das Grundfutter.

III. Periode.

Grundfutter	3,65 g N	1008,92 Cal.
Pro kg Lebendgewicht . . .	0,45 „ „	124 „

Tabelle XXVIII.

1912	N-Einnahme g	N-Ausgabe im			N am Körper g	Leb.-Gew. kg	Bemerkungen
		Harn g	Kot g	zus. g			
17.—18. II.	3,65	3,44	0,61	4,05	− 0,40	8,19	Kot mit Kieselsäure abgegrenzt. Dünnen Kot abgesetzt.
18.—19. „	3,65	3,34	0,61	3,95	− 0,30	8,11	Dünner Kot im Käfig. Auf der Tretbahn dünnen Kot abgesetzt.
19.—20. „	3,65	3,20	0,61	3,81	− 0,16	8,13	Dünnen Kot abgesetzt.
20.—21. „	3,65	3,17	0,61	3,78	− 0,13	8,16	„ „ „
21.—22. „	3,65	3,19	0,61	3,80	− 0,15	8,17	„ „ „ Kot im Käfig.
		16,34		19,39	1,14	40,76	
Mittel pro Tag	3,65	3,27	0,61	3,88	− 0,23	8,15	

Die am letzten Tage der Calciumacetatperiode bemerkbare Erhöhung des Stickstoffumsatzes setzt sich in der anschließenden Grundfutterperiode fort. Erst am 4. und 5. Tage ist das Tier in seinem Stickstoffumsatze ungefähr zur Norm zurückgekehrt. Die laxierende Wirkung des Calciumacetats macht sich in dieser Periode sehr bemerkbar (vgl. darüber die Spalte Bemerkungen in der Tabelle XXVIII). Trotzdem ist der Kot-Stickstoff nur um 0,06 g erhöht. Während dieses Versuches hat sich das Lebendgewicht des Tieres wenig verändert. Im Mittel wog die Hündin in den drei Perioden 7,97 kg, 8,12 kg und 8,15 kg.

Als hauptsächlichstes Ergebnis läßt sich feststellen, daß die Wirkung von Calciumacetat sich wesentlich von der des Natriumacetats unterscheidet. Während Natriumacetat eine lebhafte Diurese, verbunden mit einer Einschränkung des Stickstoffumsatzes bewirkt, auf die Darmtätigkeit aber keinen bemerkbaren Einfluß ausübt, hat Calciumacetat im Gegensatz dazu nicht diuretisch, wohl aber laxierend gewirkt und den N-Umsatz etwas zu steigern vermocht.

Aus den vorstehenden 6 Versuchen würde sich also ergeben, daß

1. milchsaures Ammoniak auf den Stickstoffumsatz des Fleischfressers anscheinend keine Wirkung auszuüben vermag, jedenfalls in seiner Wirkung mit dem essigsauren Ammoniak nicht vergleichbar ist;

2. essigsaures Ammoniak den Stickstoffumsatz beträchtlich einzuschränken vermag, durch eine Beigabe von viel Rohfaser aber diese Wirkung nicht zu erhöhen war;

3. essigsaures Natron eine lebhafte Diurese bewirkt, unter Einschränkung des Stickstoffumsatzes;

4. ein Gemisch von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumacetat eine stickstoffeinschränkende Wirkung nicht hat erkennen lassen, und schließlich

5. essigsaurer Kalk eine den N-Bestand des Organismus schädigende Wirkung äußerte.

Hieraus ist zunächst zu entnehmen, daß Ammoniaksalze organischer Säuren in ihrer Wirkung recht verschieden sind. Schon früher hatte ich gefunden, daß weinsaures Ammoniak sich wesentlich vom essigsauren Ammoniak unterscheidet. Das gleiche ergibt sich für das milchsaure Ammoniak, das sich jedoch, im Gegensatze zum weinsauren, das eine den Stickstoffbestand des Körpers direkt schädigende Wirkung äußerte, mehr indifferent zu verhalten scheint. Die stickstoffeinschränkende Wirkung von Ammoniaksalzen steht demnach in engem Zusammenhange mit der organischen Säure, an die das Ammoniak gebunden ist. Was die Deutung der mit Ammoniaksalzen erzielten Stickstoffretentionen betrifft, so führen alle Autoren diese Wirkung in letzter Linie auf das Ammoniak zurück. Entweder nehmen sie eine direkte Wirkung in Verbindung mit stickstofffreien Stoffen an oder eine indirekte durch die Bakterien des

Verdauungskanals, denen nicht nur eine eiweißsparende, sondern auch eine synthetische Fähigkeit zugesprochen wird. Diese Erklärungen, für die sich im Experiment manche Anhaltspunkte ergeben haben, können nun auf die stickstoffeinschränkende Wirkung des essigsauren Natrons schlechterdings keine Anwendung finden. Da drängt sich nun zunächst die Frage auf, ob es sich bei den mit Ammoniaksalzen erhaltenen Einwirkungen auf den N-Umsatz wirklich um eine auf dem Ammoniak-, resp. Stickstoffgehalt der Salze beruhende Wirkung handelt. Ich möchte auf diese zweifellos sehr wichtige Frage nur mit wenigen Worten eingehen, da es mir wünschenswert erscheint, um diese Frage eingehend zu behandeln, erst noch weiteres Zahlenmaterial beizubringen.

Was die Versuche über die Wirkung von N-freien Salzen auf den Stoffwechsel anbelangt, so möchte ich hier nicht unerwähnt lassen, daß ein Arzt in Karlsbad, Geh. Rat Dr. Jacques Mayer[1]), im Jahre 1881 eine Arbeit veröffentlicht hat („Über den Einfluß der Natronsalze auf den Eiweißumsatz im Tierkörper"), in der er mitteilte, daß nach seinen Untersuchungen Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumsulfat und Natriumphosphat den Stickstoffumsatz des Hundes herabzusetzen vermögen. Die Mayerschen Befunde fanden jedoch wegen der Versuchsanstellung (der N-Gehalt der den Tieren verabreichten Futterstoffe war z. B. durch Rechnung gefunden worden) wenig Beachtung. Ich habe jedenfalls, was Natriumacetat anbetrifft, den Mayerschen Befund bestätigt gefunden, im Gegensatz zu Salkowski und Munk, die bei Verabreichung von Natriumacetat zwar eine Abnahme des NH_3-Stickstoffs, aber eine Zunahme des Gesamtstickstoffs im Harn beobachteten.

Was die von Grafe und Abderhalden neuerdings aufgestellten Hypothesen betrifft, so möchte ich dagegen zu bedenken geben, ob es sich nicht bei den mit Ammoniaksalzen beobachteten Stickstoffretentionen nur um eine Salzwirkung handeln kann, ähnlich wie ich sie beim Natriumacetat gefunden habe. Mir will es durchaus nicht unmöglich erscheinen, daß Ammoniak in Verbindung mit Essigsäure eine ähnliche Wirkung äußert wie das an Essigsäure gebundene Natrium. Das würde

[1]) Jacques Mayer, Zeitschr. f. klin. Med. 3, 82—95, 1881.

also heißen, daß das Stickstoffatom als solches für den Stickstoffumsatz bedeutungslos wäre. Jedenfalls würde dieses, als Behauptung aufgestellt, zurzeit beweiskräftig nicht zu widerlegen sein.

Des ferneren möchte ich zu bedenken geben, daß es doch recht auffällig ist, wie verschieden die einzelnen Ammoniaksalze wirken. Sollte wirklich der Tierkörper befähigt sein, das Ammoniak synthetisch zu verarbeiten, dann bedürfte es noch einer besonderen Erklärung, warum die mit dem Ammoniak verbundenen organischen Säuren eine anscheinend ausschlaggebende Rolle bei einer ev. Stickstoffretention spielen.

Und worauf stützen sich denn die Schlüsse, die man aus den mit Ammoniaksalzen angestellten Versuchen gezogen hat? Sie finden alle ihre Stütze in der Stickstoffbilanz. Ist es aber nicht auffällig (Abderhalden l. c., S. 12, weist besonders darauf hin), daß bei Fütterungsversuchen mit Ammoniumsalzen bisher noch nie eine Zunahme des Körpergewichtes festgestellt werden konnte, wenigstens nicht, soweit sie als durch eine Wirkung des Salzes veranlaßt gelten kann. Wenn das Versuchstier von Grafe von 8,2 kg Lebendgewicht innerhalb der 3 Monate des Versuches bis auf 5,1 kg herunterkommt, also 36 % seines Körperbestandes einbüßt, kann man dann an einen eventuellen Ersatz von Eiweiß, durch synthetisch aus citronensaurem Ammoniak und Kohlenhydratkomplexen gebildetes, glauben, selbst wenn die Stickstoffbilanz diesen Schluß an die Hand gibt? Kann nicht der Stickstoffumsatz durch das Salz herabgesetzt worden sein, ähnlich wie dies durch das stickstofffreie essigsaure Natron möglich ist? Wenn der Hund wenige Tage nach Beendigung des Versuches bei normaler Nahrung (Fleisch, Milch) vollständig kollabierte, also wohl nicht mehr fähig war, Eiweiß-N zu verarbeiten, sondern dieser im Gegenteil anscheinend jetzt als Gift wirkte, kann man dann glauben, daß unter Einwirkung von citronensaurem Ammoniak eine dem Normalen entsprechende Stickstoffernährung stattgefunden hat?

Wenn es möglich ist, mit Salzen einen derartigen Einfluß auf den Stickstoffumsatz auszuüben, wie es mir mit Natriumacetat gelungen ist, dann bedarf es meines Erachtens, noch ehe man Synthesen, an denen das Ammoniak von Ammoniak-

salzen Anteil hat, annehmen kann, zunächst des Nachweises, daß hier eine stickstoffsparende Salzwirkung nicht in Betracht kommt. Diese Frage zu entscheiden, dürfte nicht ganz leicht sein. Denn die Wirkung von essigsaurem Ammoniak und essigsaurem Natron ist durchaus nicht die gleiche. Die beim Verfüttern der Salze beobachteten Nebenwirkungen sind beim Ammoniaksalz viel mildere als beim Natriumsalz, weshalb es mir auch bisher, mit Ausnahme eines Tieres (eines Foxterriers), nicht gelang, einwandfreie Versuchsreihen mit Natriumacetat durchzuführen.

Andererseits muß aber auch wieder zugestanden werden, daß durch Versuche an Wiederkäuern (ich erinnere z. B. an die von Morgen und seinen Mitarbeitern) eine indirekte Wirkung des Ammoniaks durch Bakterien im Pansen wohl als bewiesen anerkannt werden kann. Fingerling hat z. B. gefunden, daß ganz junge Kälber, die noch keinen ausgebildeten Pansen besitzen, bei denen also eine Bakterientätigkeit in diesem Magen nur sehr gering ist, den Stickstoff des Ammonacetats quantitativ im Harn als Harnstoff wieder ausscheiden.

Läßt sich trotz dieser anscheinend bewiesenen Bakterienwirkung nicht auch beim Wiederkäuer eine stickstoffsparende Salzwirkung annehmen? Sollten fundamentale Unterschiede in der Stickstoffernährung der Wiederkäuer und der Fleischfresser bestehen? Wie man sieht, tun sich hier eine Menge Fragen auf, die einwandfrei zu beantworten mit manchen Schwierigkeiten verknüpft sein dürfte.

Wenn ich hier diesen Betrachtungen Raum gegeben habe, so möchte ich besonders betonen, daß es sich beim Vergleich der stickstoffeinschränkenden Wirkung von essigsaurem Natron und Ammoniaksalzen lediglich um Vermutungen von mir handelt. Wie weit diesen durch Belegen mit Zahlenmaterial Wahrscheinliches zukommt, werden vielleicht weitere Untersuchungen ergeben, mit denen ich zurzeit beschäftigt bin.

Über die Cholesterase der Blutkörperchen.

Von

Seweryn Cytronberg.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 31. Juli 1912.)

Durch Versuche von J. H. Schultz[1]) ist vor kurzem gezeigt worden, daß die Cholesterinester gespalten werden in einem Gemisch von Blut und Leberextrakt vom Pferde, das man unter Zusatz eines geeigneten Antiseptikums während 48 Stunden in der Wärme stehen läßt.

In einem Versuche, der mit Pferdeblut allein angestellt worden war, war eine solche Spaltung nicht beobachtet worden. Und auch 2 Versuche am Menschen waren widersprechend ausgefallen. Ein cholesterinspaltendes Enzym schien also im Blut nicht vorhanden zu sein, was mit den Beobachtungen, die Kenro Kondo[2]) bei Anwendung einer anderen Methode gemacht hatte, in Übereinstimmung stand.

Bei einer Nachprüfung der Angaben von J. H. Schultz, die ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Röhmann unternahm, stellte sich aber heraus, daß auch im Pferdeblut allein die in ihm vorhandenen Cholesterinester gespalten werden. Die Menge des nach Windaus durch Digitonin fällbaren Cholesterins nahm beim Stehen des Blutes in der Wärme zu. Dieser Widerspruch zwischen meinen Erfahrungen und denen von Schultz vermag ich nur durch die Annahme zu erklären, daß letzterer zu jener Zeit mit der Windausschen Methode und ihren Schwierigkeiten noch nicht genügend vertraut war.

---

[1]) Diese Zeitschr. 42, 255, 1912.

[2]) Diese Zeitschr. 27, 436, 1910.

J. H. Schultz hatte dann aber weiter gefunden, daß die Spaltung der Cholesterinester in einem Gemisch von Blutserum und Leberextrakt nicht eintritt. In Übereinstimmung hiermit fand auch ich, daß im Blutserum bzw. Blutplasma allein die Cholesterinester nicht gespalten werden.

Die Erklärung dieser Tatsachen wird am einfachsten gegeben durch die Annahme, daß die Blutkörperchen ein cholesterinesterspaltendes Enzym — eine Cholesterase — enthalten.

Bei diesen Versuchen stellte sich auch heraus, daß die Blutkörperchen entgegen der Angabe von E. Hepner[1]) nicht nur freies Cholesterin, sondern auch Cholesterinester enthalten. Bestimmt man nämlich die Menge von freiem Cholesterin und Gesamtcholesterin im Gesamtblut und im Blutplasma bzw. im Blutserum und kennt man das Verhältnis der letzteren zum Gesamtblut, so läßt sich die Verteilung von freiem Cholesterin und gebundenem Cholesterin auf die Blutflüssigkeit und die Blutkörperchen berechnen. Auf diese Weise wurde gefunden für die Blutkörperchen, die in 100 ccm Blut enthalten sind:

in Versuch 3: freies Cholesterin 0,0389 g, Gesamtcholesterin 0,1012 g, Q 37,5;

in Versuch 4: freies Cholesterin 0,0461 g, Gesamtcholesterin 0,0930 g, Q 49,5.

Beachtenswert ist auch das Verhalten der Verseifungszahl. In allen Versuchen mit Pferdeblut nahm sie ab. Diese Abnahme kann im Gesamtblut bedingt sein durch die Spaltung der Cholesterinester und eine gleichzeitige Spaltung von Fett und Lecithin im Blutserum, wo sie etwa ebenso groß war und die Cholesterinester nicht gespalten wurden, nur durch letztere[2]).

Versuche.

Die Methode war im wesentlichen die von J. H. Schultz angewendete, nur mit folgenden Abweichungen: 1. Die eingeengten Alkoholextrakte wurden ohne weiteres mit Essigäther extrahiert. Der Essigätherextrakt wurde vor dem Einengen unter der Wasserleitung abgekühlt und filtriert. Da die Menge des Essigäthers verhältnismäßig groß ist und die Mengen des Cholesterins verhältnismäßig sehr klein sind, so ist ein Ausfallen des Cholesterins beim Abkühlen nicht zu befürchten. 2. Der in Äther gelöste Anteil des Essigätherrückstandes, der zur Be-

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 73, 600, 1898.

[2]) Vgl. R. Weigert, Arch. f. d. ges. Physiol. 82, 86, 1900.

stimmung des freien Cholesterins nach Windaus diente, wurde allmählich zu der heißen, nicht siedenden alkoholischen Digitoninlösung, die sich auf dem heißen Wasserbade befand, hinzugegeben, nicht umgekehrt. 3. Zur Entfernung des Fettes und der Schmieren wurde das Digitonincholesterid erst gründlich mit warmem Alkohol und dann mit Äther gewaschen. 4. Zu jeder Bestimmung wurde der Gootchtiegel neu mit Asbest beschickt. 5. Bei der Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde die wässerig alkoholische Seifenlösung mit Petroläther nicht ausgeschüttelt, sondern in einem kontinuierlichen Verfahren ausgewaschen.

Versuch	Zur Bestimmung verwendet	Verseifungszahl des Essigätherextrakts	Cholesterin frei	Cholesterin gesamt	Q
1	200 ccm Pferdeblut:				
	a) sofort gefällt	136,0	0,0676	0,2139	31,4
	b) nach 48 Stunden . . .	81,3	0,1350	0,2297	58,7
	c) „ 96 „ . . .	46,1	0,1599	0,2025	78,9
2	200 ccm Pferdeblut:				
	a) sofort gefällt	156,1	0,0621	0,1680	36,6
	b) nach 48 Stunden . . .	101,3	0,1710	0,1940	88,7
	c) „ 96 „ . . .	55,2	0,1724	0,1880	91,7
3	200 ccm Pferdeblut[1]):				
	a) sofort gefällt	102,5	0,0985	0,2720	36,1
	b) nach 48 Stunden . . .	66,2	0,1632	0,2652	61,6
	c) „ 96 „ . . .	55,4	0,1718	0,2428	70,8
	200 ccm Serum des Blutes:				
	a) sofort gefällt	117,6	0,0495	0,1596	31,0
	b) nach 48 Stunden . . .	83,1	0,0490	0,1533	31,9
	c) „ 96 „ . . .	65,2	0,0498	0,1600	30,0
4	200 ccm Pferdeblut[2]) . . .	—	0,0600	0,1270	47,2
	200 „ Oxalatplasma . .	—	0,0218	0,0530	40,0
5	170 ccm Hundeblut:				
	a) sofort gefällt	120,5	0,1266	0,2511	50,4
	b) nach 48 Stunden . . .	Zunahme d.	0,1704	0,2512	68,0
	c) „ 96 „ . . .	Alkalescenz	0,1946	0,2534	76,3

[1]) Verhältnis von Gesamtblut zu Serum wie 100 : 43.
[2]) Verhältnis von Gesamtblut zu Serum wie 100 : 63,7.

Beitrag zum Studium der Magenlipase.

Von

Heinrich Davidsohn.

(Aus dem biologischen Laboratorium des Städtischen Krankenhauses am Urban, Berlin.)

(Eingegangen am 1. August 1912.)

Es dürfte bekannt sein, daß die Ansichten über das Bestehen einer Magenlipase immer noch geteilt sind.

Die Anschauung der älteren Physiologen ging dahin, daß die Fette im Magen nicht oder nur in sehr geringem Umfange gespalten werden. Diese Anschauung stützte sich auf Experimente, die größtenteils aus der Beobachtung des Verhaltens von nicht emulgierten Fetten im Magen gewonnen waren. Aus den Arbeiten von Volhard[1]) geht aber hervor, daß man zu ganz anderen Resultaten gelangt, wenn man als Substrat gut emulgierte Fette, wie Eigelbemulsion oder Milch verwendet, eine Tatsache, die von allen Nachuntersuchern bestätigt worden ist. Unter Anwendung gut emulgierter Fette konnte Volhard ein fettspaltendes Ferment sowohl im ausgeheberten Mageninhalt wie im Glycerinextrakt aus der Fundusschleimhaut des Magens nachweisen. Daß bei Benutzung der Volhardschen Methodik eine Fettspaltung im Magen in der Tat zu beobachten ist, muß nach den zahlreichen entsprechenden Untersuchungen anderer [Pekelharing[2]), Stade[3]), Zinßer[4]), Meyer und Winternitz[5]), Heinsheimer[6]), Sedgwick[7])] als richtig anerkannt werden, wenn auch über den Grad der Fettspaltung die Meinungen der Autoren etwas verschieden sind. Dagegen hat Inouye[8]) Versuche

---

[1]) Volhard, Zeitschr. f. klin. Med. **42**, 414, 1901 und **43**, 397, 1901.

[2]) Pekelharing, Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 22.

[3]) Stade, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 291, 1902.

[4]) Zinßer, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **7**, 31, 1906.

[5]) Meyer und Winternitz, Verhdl. d. Kongr. f. inn. Med. **22**, 290, 1905.

[6]) Heinsheimer, Deutsche med. Wochenschr. **1906**, Nr. 32, S. 1196.

[7]) Sedgwick, Jahrb. f. Kinderheilk. **64**, 194, 1906.

[8]) Inouye, Arch. f. Verdauungskrankh. **9**, 250, 1903.

mitgeteilt, nach denen verschiedenfach hergestellte Glycerinextrakte der Magenschleimhaut ohne Wirkung auf natürlich und künstlich hergestellte Fettemulsionen waren, während Fromme[1]), der unter Volhards Leitung an Extrakten aus Hunde- und Schweinemagenschleimhaut gearbeitet hat, zu positiven Resultaten gelangt ist, ebenso wie Ibrahim und Kopeć[2]), die den Magen neugeborener Kinder untersucht haben, und Finizio[3]), der die Magenschleimhaut zweier Kinderleichen extrahiert hat.

Der Umstand, daß nach den Versuchen von Boldireff[4]) durch eine fettreiche Nahrung ein Rückfluß von Pankreassaft in den Magen bewirkt wird, hat weiterhin zu der Behauptung Veranlassung gegeben, daß die im Magen aufgefundene Lipase dem Pankreas entstammt. Diese Behauptung wird erstens gestützt durch die bezüglich der Existenz einer Lipase negativen Ergebnisse Londons[5]) an seinem reinen Pylorusfistelhunde, zweitens durch die Resultate von Meyer und Winternitz[6]), die im Magen von Hunden, bei denen die Kommunikation zwischen Magen und Darm auf verschiedene Weise ausgeschaltet wurde, eine Lipolyse vermißt haben, und schließlich durch den Befund Rietschels[7]), der im kleinen Magen säugender Ferkel wohl Pepsin und Lab, aber keine Lipase nachweisen konnte. Dieser Anschauung widerspricht aber die mehrmals geglückte Feststellung einer Lipase im Safte des kleinen Magens eines Pawlowschen Fistelhundes [Volhard[8]), Laqueur[9]), Heinsheimer[10])]. Der negative Befund von Rietschel[7]) ist nach Laqueur[9]) sowie nach Ibrahim und Kopeć[11]) nicht als beweisend anzusehen, da das als Antisepticum angewendete Toluol die Wirkung der Magenlipase erheblich beeinflußt. Einen weiteren Beweis für die Existenz einer eigenen Magenlipase sehen Ibrahim und Kopeć[11]) in dem Umstande, daß das Invertin, das sie bei älteren Foeten stets unterhalb der Pylorusklappe fanden, in 3 darauf untersuchten Fällen stets im Mageninhalt vermißt wurde. Es leuchtet ein, daß ein derartiger Befund die Anschauung von dem Rückfluß von Pankreassaft in den Darm sehr unwahrscheinlich macht.

Bei diesem Zwiespalt der Anschauungen erschien es mir ein Bedürfnis, die Frage nach der Existenz einer Magenlipase

---

[1]) Fromme, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 51, 1906.
[2]) Ibrahim und Kopeć, Zeitschr. f. Biol. 53, 201, 1910.
[3]) Finizio, La Pediatria, Januar 1910, ref. Jahrb. f. Kinderheilk. 71, 503, 1910.
[4]) Boldireff, Centralbl. f. Physiol. 18, 460, 1904.
[5]) London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 125, 1907.
[6]) Meyer und Winternitz, l. c.
[7]) Rietschel. Monatsschr. f. Kinderheilk. 6, 333, 1907.
[8]) Volhard, l. c.
[9]) Laqueur, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 281, 1906.
[10]) Heinsheimer, l. c.
[11]) Ibrahim und Kopeć, l. c.

noch weiter zu studieren. Mein Plan ging dahin, verschiedene Eigenschaften des fettspaltenden Fermentes im Pankreas und im Magen in exakter Weise zu untersuchen, in der Vermutung, daß dabei Differenzen zutage treten könnten, die das Bestehen zweier verschiedener Fermente beweisen würden. Die von mir angewendete und bereits anderen Orts beschriebene[1]) Methode zur Prüfung einer Fettspaltung im Magensaft unterscheidet sich prinzipiell von den früheren und lehnt sich an die von Rona und Michaelis[2]) bei ihren Untersuchungen über Fettspaltung im Serum angegebene an. Der Grund, der mich bewogen hat, die bisher geübte Methode zu verlassen, ist einmal in den schon von Saxl[3]) festgelegten Fehlerquellen der Titrationsmethode zu suchen und andererseits darin, daß die zweite meiner Fragen mit der älteren Versuchsanordnung unlösbar gewesen wäre.

Das Substrat bei der von mir angewendeten Methode ist keine Emulsion, sondern eine homogene Lösung, nämlich die gesättigte wässerige Lösung von Estern und einfachen Fetten. Diese Körper haben nämlich die Eigenschaft, selbst wenn sie nur in minimalen Mengen gelöst sind, die Oberflächenspannung des Wassers in beträchtlichem Maße zu erniedrigen, während ihre Spaltungsprodukte fast inaktiv sind. Untersuchungen mit dieser Methode können selbstverständlich nie eine Vorstellung von dem Ablauf der Vorgänge geben, wie sie sich bei der Fettverdauung im Magen abspielen, da ja das Substrat ein gänzlich anderes ist. Sie bietet aber große Vorteile für die experimentelle vergleichsmäßige Prüfung lipolytischer Prozesse und ist deshalb für unsere Frage sehr geeignet. Eine Schwierigkeit der Methode ist noch darin begründet, daß von den Fetten eigentlich nur Tributyrin soweit wasserlöslich ist, daß eine genügende Differenz in der Oberflächenspannung von Lösungsmittel und Lösung entsteht. Zweifelsohne wird jede Lipase imstande sein, eine gesättigte wässerige Tributyrinlösung zu spalten, es ist aber umgekehrt nicht so selbstverständlich, daß aus der Spaltung einer Tributyrinlösung immer auf das Vorhandensein einer echten Lipase geschlossen werden darf. Es

[1]) H. Davidsohn, Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 24.
[2]) P. Rona und L. Michaelis, diese Zeitschr. **31**, 345, 1911.
[3]) Saxl, diese Zeitschr. **12**, 343, 1908.

ist wichtig auf diesen Umstand hinzuweisen, wenn er auch bei der Untersuchung von Magensäften und Pankreasextrakten keine Rolle spielt, da in beiden Fällen durch vielfache Experimente das Vorhandensein einer echten Lipase erwiesen ist.

Ich möchte bei dieser Gelegenheit noch mit wenigen Worten eine Methode besprechen, die vor kurzem Izar[1]) zum Studium über Lipolyse empfohlen hat und die mit der unsrigen die stalagmometrische Messung gemeinsam hat. Während hier aber die Oberflächenspannung in echten Lösungen beobachtet wird, verwendet Izar künstlich hergestellte Emulsionen, und zwar vornehmlich solche von Triolein. Es muß von vornherein großen Zweifeln begegnen, daß es auf diese Weise möglich sein soll, eine Fettspaltung nachzuweisen. Es gelten nämlich für die Oberflächenspannung mehrphasiger Systeme sicherlich kompliziertere Bedingungen als für die einphasigen. Im Falle der gesättigten wässerigen Tributyrinlösung, also in einem einphasigen System, ist die oberflächenerniedrigende Wirkung des gelösten Stoffes entsprechend seiner Konzentration durchaus begreiflich. Weniger begreiflich aber wäre es, wenn in einer Emulsion geringe Konzentrationsänderungen der öligen Phase einen wesentlichen Einfluß auf die Oberflächenspannung der Emulsion haben würden. Überdies erniedrigt das in Lösung gehende Natriumoleat nach unseren Erfahrungen, die allerdings im Gegensatz zu den Angaben von Izar stehen, die Oberflächenspannung bereits so bedeutend, daß die Behauptung, man könnte den Fortgang der Lipolyse durch Beobachtung der Oberflächenspannungserhöhung solcher Emulsionen feststellen, wenig wahrscheinlich klingt. Einige Stichproben, die ich nach den Angaben von Izar mit dem Serum von Kaninchen und vom Hund sowie mit Pankreasextrakten unternommen habe, haben die Richtigkeit unserer Zweifel bewiesen. Meine Versuche haben nämlich gezeigt, daß Sera und Pankreasextrakte, die auf Tributyrin eine starke Lipolyse ausüben, die Oberflächenspannung der Izarschen Emulsionen bei beliebig langer Einwirkung nicht verändern.

Einige Beispiele mögen dies erläutern. Es sei nur noch erwähnt, daß ich zunächst nur ganz frische, sofort nach der

[1]) Izar, diese Zeitschr. 40, 390, 1912.

Gewinnung zentrifugierte Sera verwendet habe. Da ich mich aber mehrfach davon überzeugt habe, daß eingefrorene Sera ihre fettspaltende Fähigkeit gegenüber der gesättigten wässerigen Tributyrinlösung mehrere Tage lang bewahren, habe ich später unter gleichzeitiger Ansetzung einer Kontrolle auch ältere eingefrorene Sera verwendet. Die Messung der Oberflächenspannung wurde ausgeführt durch Zählung der Tropfen, die aus einer geeichten Capillare mit dem Wasserwert von etwa 100 Tropfen ausflossen.

Versuch 1.

20 ccm einer „gesättigten alkoholischen Trioleinlösung" werden filtriert und mit destilliertem Wasser auf 200 ccm aufgefüllt. 95 ccm dieser Emulsion werden mit 0,5 ccm eines frischen, sofort nach der Gerinnung zentrifugierten Kaninchenserums versetzt. Eine unmittelbar nach der Vermischung vorgenommene Tropfenzählung mit unserer Capillare (Wasserwert 100 Tropfen) im Wasserbad von 19° ergibt 146 Tropfen. Die Emulsion wird sofort in ein Wasserbad von 37,5° gestellt. Nach 70 Minuten wird eine Probe entnommen, innerhalb 10 Minuten auf 19° abgekühlt und wieder die Tropfenzahl bestimmt = 149 Tropfen.

Versuch 2.

95 ccm einer wie im Versuch 1 verwendeten frisch hergestellten Emulsion werden mit 5 ccm frischem Hundeserums vermischt. Die sofortige Zählung einer Probe im Wasserbad von 19° ergibt 144 Tropfen. Der Hauptteil kommt in ein Wasserbad von 37,5°. Nach 30 Minuten wird eine Probe entnommen, innerhalb 13 Minuten auf 19° abgekühlt und gezählt = 145 Tropfen. Zweite Probe, nach 60 Minuten entnommen, in 6 Minuten abgekühlt = 144 Tropfen; dritte Probe, nach 90 Minuten entnommen und in 10 Minuten abgekühlt = 144 Tropfen; vierte Probe nach 24 Stunden entnommen und abgekühlt = 148 Tropfen.

Versuch 3.

A. 95 ccm einer gleichen Emulsion werden mit 5 ccm eines eingefrorenen Kaninchenserums vermischt und wie in Versuch 2 behandelt. Spaltung im Wasserbad von 37,5°; Zählung im Wasserbad von 19°. Erste Probe sofort nach der Vermischung = 146 Tropfen, zweite Probe nach 60 Minuten entnommen, in 15 Minuten abgekühlt = 145 Tropfen; dritte Probe nach 90 Minuten entnommen und in 12 Minuten abgekühlt = 145 Tropfen, vierte Probe nach 120 Minuten entnommen und in 11 Minuten abgekühlt = 142 Tropfen.

B. 60 ccm vom Filtrat einer gesättigten wässerigen Tributyrinlösung werden zur Kontrolle mit 1 ccm des Kaninchenserums von Versuch 3 A (am gleichen Tage) versetzt und im Wasserbad von 19° beobachtet sowie gezählt. Tropfenzahl der Tributyrinlösung = 159 Tropfen.

Nach 0 Minuten	159 Tropfen
„ 20 „	144 „
„ 40 „	133 „
„ 60 „	124 „

Es sei noch bemerkt, daß in diesem wie in allen übrigen Versuchen der Tropfenwert der vor jedem Versuch noch zweimal gemessenen Tributyrinlösung stets gleich dem Wert bei 0 Minuten gesetzt wurde, weil es sonst kaum möglich gewesen wäre, den Beginn des Prozesses festzuhalten.

Versuch 4.

Wiederholung von Versuch 3.

A. Spaltung im Wasserbad von 37,5°; Zählung im Wasserbad von 19°.

1. Probe sofort nach dem Vermischen	= 148 Tropfen
2. „ nach 60 Minuten entnommen und auf 19° abgekühlt	= 146 „
3. „ „ 90 „ „	= 148 „
4. „ „ 48 Stunden „	= 150 „

B. Wasserbad von 19°.

Nach 0 Minuten	159 Tropfen
„ 20 „	142 „
„ 40 „	127 „
„ 60 „	122 „

Versuch 5.

A. 95 ccm einer Trioleinemulsion wie in Versuch 1 werden mit 5 ccm einer 1 % igen wässerigen Aufschwemmung von Pankreatin Rhenania versetzt und wie vorher behandelt. Die späteren Versuche werden zeigen, daß dieses Handelspräparat eine sehr wirksame Lipase enthält. Wasserbad von 37,5°; Zählung im Wasserbad von 19°.

1. Probe sofort nach Vermischen	= 147 Tropfen
2. „ nach 30 Min. entnommen und auf 19° abgekühlt	= 147 „
3. „ „ 60 „ „ „ „ 19° „	= 149 „
4. „ „ 90 „ „ „ „ 19° „	= 154 „
5. „ „ 48 Std. „ „ „ 19° „	= 152 „

B. Wiederholung von A mit einer entsprechenden Menge vom Filtrat der 1 % igen Pankreatinaufschwemmung. Auch das Filtrat enthält, wie später gezeigt werden wird, ein lipolytisches Ferment.

1. Probe sofort nach Vermischen	= 145 Tropfen
2. „ nach 30 Min. entnommen und auf 19° abgekühlt	= 146 „
3. „ „ 60 „ „ „ „ 19° „	= 148 „
4. „ „ 90 „ „ „ „ 19° „	= 149 „
5. „ „ 48 Std. „ „ „ 19° „	= 151 „

C. Zur Feststellung der lipolytischen Wirksamkeit des verwendeten Pankreatinpräparats, die übrigens einwandfrei aus den später protokollierten, mit viel kleineren Mengen der gleichen Fermentlösung angestellten Tributyrinversuchen hervorgeht, werden je 95 ccm der Trioleinemulsion mit 5 ccm der 1%igen Pankreatinaufschwemmung resp. des Filtrats versetzt und bei 37° auf den Zuwachs an Titrationsacidität beobachtet. Indicator ist Phenolphthalein; titriert wird mit $^n/_{10}$-Lauge und durch Kontrollen mit gekochten Fermentlösungen der Anfangstiter bestimmt.

	Zuwachs in ccm $^n/_{10}$-NaOH nach	
	90 Minuten	48 Stunden
1%ige Pankreatinaufschwemmung .	0,48	0,69
1%iges Pankreatinfiltrat	0,29	0,51

Der geringe Ausschlag der Titrationsacidität bei diesem Versuch bietet nichts Befremdliches, da ja die nach den Angaben Izars hergestellte Emulsion nur sehr wenig Triolein enthält. Gegenüber anderen Emulsionen (vgl. Vers. 7) konnten mit der gleichen Pankreatinlösung viel größere titrierbare Umsätze erzielt werden.

Ich bin nicht in der Lage, diese den Resultaten Izars widersprechenden Ergebnisse befriedigend zu erklären; ich habe mich bemüht, genau nach seinen Vorschriften zu arbeiten, und glaube deshalb nicht, daß sie auf eine Änderung der Versuchsanordnung zurückzuführen sind. Nur der Vorschrift, die auf 37° erwärmten Emulsionen spontan innerhalb 60 Minuten abkühlen zu lassen, bin ich absichtlich nicht gefolgt, da mir diese Maßnahme für quantitative Untersuchungen von fermentativen Prozessen nicht geeignet erschien.

Die von mir zum Studium der Lipolyse angewendete Methode bestand darin, daß 60 ccm vom Filtrat der gesättigten wässerigen Tributyrinlösung mit 1 ccm der Fermentlösung versetzt und in Zwischenräumen von je 20 Minuten die Oberflächenspannung stalagmometrisch bestimmt wurde. Der Fermentprozeß wurde im Wasserbade von 19° beobachtet, zwecks Herstellung einer gut definierten Reaktion wurde, wie aus den Protokollen hervorgeht, zu jeder Versuchslösung noch ein passender Reaktionsregulator hinzugesetzt.

Die fermentative Spaltung der Tributyrinlösung geht nun so vor sich, daß zunächst die Abnahme der Tropfenzahl sehr stark ist, aber allmählich so langsam wird, daß sie für das von uns gewählte Zeitintervall fast unmerklich ist. Selbstverständ-

lich ist nur der erste Teil des Prozesses für quantitative Untersuchungen brauchbar. Es wurden deshalb stets in einem Vorversuch mehrere Fermentverdünnungen geprüft und diejenige als geeignet für den Hauptversuch angesehen, die innerhalb der ersten 60 Minuten fast geradlinig verlief. Das folgende Beispiel soll einen derartigen Versuch illustrieren.

Versuch 6.

3 Kolben mit je 60 ccm vom Filtrat der gesättigten wässerigen Tributyrinlösung werden versetzt mit 0,5 ccm $^{m}/_{3}$ primärem Natriumphosphat und 0,5 ccm $^{m}/_{3}$ sekundärem Natriumphosphat. Dazu kommen je 1 ccm der Magensaftverdünnung, und zwar enthält:

I. 1 ccm 2fach verdünnten Magensaftes,
II. 1 „ 2,5fach „ „
III. 1 „ 3,3fach „ „

Die Zählungen ergeben:

	I.	II.	III.	
Nach 0 Minuten	159	159	159	Tropfen
„ 20 „	145	150	154	„
„ 40 „	137	143	144	„
„ 60 „	129	135	137	„
„ 80 „	—	128	—	„

Nr. II wurde als geeignet für den Hauptversuch angesehen.

Ich habe mich durch eine große Anzahl von Versuchen davon überzeugt, daß man mit dieser Methode zu brauchbaren Werten gelangt. Auf die Frage der zugesetzten Reaktionsregulatoren komme ich später zurück.

Als Magensaft diente mir der $^{3}/_{4}$ Std. nach einem Ewaldschen Probefrühstück ausgeheberte filtrierte Inhalt erwachsener, meistens magengesunder Menschen. Wieviel von dem im Mageninhalt enthaltenen lipolytischen Ferment in das Filtrat übergeht, habe ich nicht geprüft; es erschien mir jedenfalls der leichteren Abmessung halber besser, mit dem Filtrat als mit dem Mageninhalt selbst zu operieren.

Als Pankreasextrakte verwendete ich in Ermangelung menschlichen Pankreassaftes, der natürlich das Vergleichsobjekt hätte sein müssen, das Handelspräparat Pankreatin Rhenania, das nach einem brieflichen Bericht der Firma aus Schweineorganen hergestellt ist; die Berechtigung zu dieser Anordnung bietet die Maßnahme, daß das trypische Ferment beider Spezies

identisch ist. Wenn auch die allgemeine Erfahrung diese Annahme als begründet erscheinen läßt, so muß es doch einem glücklichen Untersucher überlassen bleiben, diese Identität noch experimentell zu erhärten und damit die letzte Lücke der Beweiskette auszufüllen. Ich gebrauchte zunächst wässerige Aufschwemmungen vom Pankreatin Rhenania, da die Pankreaslipase als wasserunlöslicher Bestandteil in diesem Präparat enthalten sein soll. Trotz Innehaltung aller Kautelen gelang es mir aber nicht, auf diesem Wege gut reproduzierbare Werte zu bekommen, vermutlich wegen der Schwierigkeit stets gleiche Mengen der Aufschwemmung abzumessen. Ich prüfte deshalb, ob nicht so viel von dem Ferment in das Filtrat überginge, daß ich Pankreatinfiltrate statt der Aufschwemmungen verwenden konnte. Es zeigte sich, daß dies in der Tat möglich ist, und ich überzeugte mich noch durch Untersuchungen an künstlichen Emulsionen und Titration der abgespaltenen Fettsäuren, daß das in das Filtrat übergehende Ferment eine echte Lipase war.

Meine Versuche zeigten ferner, daß die günstigsten Bedingungen erreicht wurden durch 5 Minuten langes Schütteln der Pankreatinaufschwemmung. Zum Beweis diene folgender Versuch:

Versuch 7.

200 ccm einer 1%igen Pankreatinaufschwemmung wurden 5 Min. im Schüttelapparat geschüttelt, eine Probe (= Nr. I) abgenommen, der Hauptteil weitere 15 Min. geschüttelt und wieder eine Probe (= Nr. II) entnommen. Der noch bleibende Rest wurde im ganzen 1 Std. geschüttelt. Nr. III stellte das Filtrat von einem Drittel des Restes dar, Nr. IV ein Drittel der Aufschwemmung und Nr. V das letzte Drittel der Aufschwemmung, mehrfach aufgekocht. Es wurden nun in 5 Kolben je 20 ccm der entsprechenden Pankreatinlösung gefüllt, mit 10 ccm einer Olivenölemulsion sowie mit 4 Tropfen Toluol versetzt und für 24 Std. in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tage wurde jeder Kolben mit 50 ccm 70%igen Alkohols und 10 ccm Äther versetzt. Die abgespaltenen Fettsäuren wurden gegen Phenolphthalein als Indicator mit $^{n}/_{10}$-NaOH titriert.

Die verbrauchten Mengen $^{n}/_{10}$-NaOH betrugen in ccm:

I	23,30 ccm
II	21,71 „
III	21,54 „
IV	30,16 „
V	15,04 „

Ein wie großer Teil der Pankreaslipase in das Filtrat übergeht, läßt sich natürlich aus solchen Versuchen nicht abschätzen; doch kann man schon jetzt unter Berücksichtigung der vorher genannten Versuche anderer Autoren annehmen, daß es sich nur um einen kleinen Teil handeln wird. Vermutlich liegt hier ein Vorgang vor ganz ähnlich dem beim „Bluten" der Farbstoffe, insofern als durch das Schütteln ein Teil des an Kolloide adsorbierten Fermentes in Lösung übergeht.

Für die Versuche mit der Tributyrinlösung genügte mir eine $^1/_4{}^0/_0$ige Pankreatinlösung.

Mit der im Vorhergehenden ausführlich beschriebenen Methode habe ich die Lipase des Magensaftes und der Pankreatinlösungen nach zwei Gesichtspunkten hin geprüft, nämlich einmal bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Natriumfluorid und zweitens hinsichtlich der für das Optimum der Fermentwirkung erforderlichen Wasserstoffionenkonzentration.

Zwei amerikanische Autoren Loevenhart und Pierce[1]) haben sich schon vor einiger Zeit mit dem hemmenden Einfluß von Natriumfluorid auf lipolytische Vorgänge beschäftigt und dabei interessante Beobachtungen gemacht. Die Autoren wählten als Substrat Olivenöl und verschiedene Ester, als Methode zur Feststellung der Spaltung die Titration.

Die Autoren konnten zeigen, daß eine Natriumfluoridkonzentration von 1 : 5000 noch imstande ist, die Einwirkung von Pankreasextrakten auf Olivenöl um $2^0/_0$ zu hemmen, daß eine Natriumfluoridkonzentration von 1 : 500 den gleichen Vorgang bereits um $50^0/_0$ hemmt. Sie zeigten ferner, daß die Hydrolyse von Äthylbutyrat durch Pankreasextrakt 100 bis 1000 mal empfindlicher gegenüber Natriumfluorid ist, als die Hydrolyse von Olivenöl unter denselben Bedingungen.

Sehr kleine Mengen von Natriumfluorid sollen nach den gleichen Autoren die Hydrolyse der Fette beschleunigen. Auch zu der Frage, ob die hemmende Wirkung von Natriumfluorid etwa durch die Ausfällung von Calcium bewirkt wird, nehmen Loevenhart und Pierce Stellung. Sie verneinen diese Frage, erstens weil die Menge des erforderlichen Natriumfluorids so gering war, daß die betreffende Menge Calciumfluorid noch löslich war, zweitens weil Ammoniumoxalat die Reaktion nicht

[1]) Loevenhart u. Pierce, Journ. of. Biolog. Chem. 2, Nr. 5, 1907.

hemmt und schließlich weil der Zusatz von Calciumchlorid die hemmende Wirkung des Fluorids nicht beeinflußte.

Meine eigenen Untersuchungen haben gezeigt, daß eine beträchtliche Differenz besteht in dem hemmenden Einfluß von Natriumfluorid gegenüber der Spaltung von Tributyrinlösungen durch Magensaft einerseits und Pankreasfiltrat andererseits.

Bei den Versuchen mit Magensaft war bei einer Konzentration an Natriumfluorid von 1:1600 Wasser eine Hemmung der Spaltung nicht mehr nachweisbar, bei einer Konzentration von 1:400 betrug die Hemmung 66%, berechnet nach der Annahme, daß die wirkenden Fermentteile bei gleichem Umsatz umgekehrt proportional den verbrauchten Zeiten sind. Bei den Versuchen mit Pankreatinlösung ergab sich als sicheres Resultat, daß die Empfindlichkeit gegenüber Natriumfluorid viel größer war und erst ganz allmählich aufhörte. In den meisten Versuchen konnte erst bei einer Konzentration an Natriumfluorid von 1:80000 Wasser ein Aufhören der Hemmung beobachtet werden, mitunter lag die Grenze etwas höher oder niedriger, in einem Versuch sogar erst bei 1:240000. Die folgenden Beispiele mögen den Verlauf dieser Versuche veranschaulichen.

Versuch 8.

Wasserbad von 18°. Im Vorversuche enthält jeder Kolben 60 ccm Tributyrinlösung, 0,5 ccm $^{n}/_{3}$ primäres Natriumphosphat und 0,5 ccm $^{n}/_{3}$ sekundäres Natriumphosphat. Dazu kommt je 1,0 ccm Magensaft, und zwar I = 2fach verdünnt, II = 4fach verdünnt, III = 6fach verdünnt. Die Zählungen ergaben folgendes Resultat:

	I	II	III	
Nach 0 Minuten	144	144	144	Tropfen
„ 20 „	123	131	134	„
„ 40 „	114	121	126	„
„ 60 „	—	115	115	„

Der Hauptversuch wird wie Nr. III viermal angesetzt; die vier Kolben enthalten außerdem verschiedene Mengen von Natriumfluorid gelöst. Das Ergebnis ist folgendermaßen:

	I	II	III	IV	
Nach 0 Minuten	144	144	144	144	Tropfen
„ 20 „	142	135	137	134	„
„ 40 „	139	129	127	126	„
„ 60 „	134	126	115	117	„
Konzentration an Natriumfluorid	1:400	1:800	1:1600	1:3200	

Versuch 9.

Anordnung wie Versuch 8; der Magensaft ist 4fach verdünnt; Vor- und Hauptversuch sind in ein Protokoll zusammengefaßt.

	I	II	III	IV	V	
Nach 0 Minuten	144	144	144	144	144	Tropfen
„ 20 „	138	134	133	133	138	„
„ 40 „	138	127	125	123	125	„
„ 60 „	133	120	116	118	121	„
„ 80 „	133	118	116	110	116	„
Konzentration an Natriumfluorid	1:400	1:800	1:1600	1:3200	0	

Die in diesem Versuch zutage tretende Beschleunigung nicht mehr hemmender Mengen von Natriumfluorid, die den Angaben von Loevenhart und Pierce entspricht, ist auch noch in einigen anderen Versuchsprotokollen erkennbar gewesen und deutet auf den spezifischen Einfluß hin, den dieses Salz der Lipase gegenüber einnimmt.

Versuch 10.

Wasserbad von 18°. Der Vorversuch, ganz entsprechend dem von Versuch 7, hat ergeben, daß 1,0 ccm vom Filtrat einer 0,2%igen Pankreatinaufschwemmung den gewünschten Verlauf zeigt. Der wichtigste Teil des Hauptversuches zeigt folgendes Ergebnis:

	I	II	III	IV	V	
Nach 0 Minuten	142	142	142	142	142	Tropfen
„ 20 „	138	135	133	131	132	„
„ 40 „	129	129	124	123	123	„
„ 60 „	129	125	121	119	119	„
Konzentration an Natriumfluorid	1:2650	1:8000	1:24000	1:80000	0	

Versuch 11.

Anordnung wie Versuch 10; der Vorversuch hat als günstigste Fermentmenge 1,0 ccm einer 0,25%igen Pankreatinlösung ergeben.

	I	II	III	IV	V	
Nach 0 Minuten	142	142	142	142	142	Tropfen
„ 20 „	139	139	135	136	132	„
„ 40 „	133	133	129	127	124	„
„ 60 „	131	131	127	126	121	„
„ 80 „	128	127	118	121	—	„
Konzentration an Natriumfluorid	1:2650	1:8000	1:24000	1:80000	0	

In Versuch 10 hemmt also die Konzentration an Natriumfluorid von 1:80000 Wasser sogar noch etwas; man hätte weitere Verdünnungen von Natriumfluorid anwenden müssen, um den Grenzwert zu erreichen.

Die Differenz in der Empfindlichkeit gegenüber Natriumfluorid ist also sehr erheblich; die Magenlipase zeigt sich etwa 50 mal resistenter.

Durch Differenzen in der Reaktion kann dieser Unter-

schied nicht erklärt werden, da der zugesetzte Reaktionsregulator — kontrollierende Messungen mit Konzentrationsketten haben das bewiesen — dafür gesorgt hat, daß die Reaktion auch während des Fortgangs des Prozesses konstant blieb. Den Einwand, daß ein verschiedener Gehalt an Calcium im Magensaft und Pankreatinlösung die Ursache dieses Phänomens sei, muß ich unter Hinweis auf die oben erwähnten Schlußfolgerungen von Loevenhart und Pierce zurückweisen. Überdies war die Menge der Fermentlösungen in unseren Versuchen noch viel kleiner als die der genannten Autoren, da beispielsweise 1 ccm eines 4 fach verdünnten Magensaftes oder 1 ccm einer 0,2 bis 0,3 $^0/_0$ igen Pankreatinlösung auf ein Gesamtvolumen von 62 ccm für einen Versuch benutzt wurde. Schließlich habe ich als Experimentum crucis noch geprüft, ob der Zusatz von 1 ccm gekochten Magensaftes die Empfindlichkeit einer Pankreatinlösung gegenüber Natriumfluorid verändern kann. Der Versuch bewies die völlige Bedeutungslosigkeit des Zusatzes, so daß notwendigerweise die verschiedene Empfindlichkeit gegenüber Natriumfluorid mit der Annahme zweier verschiedener Fermente erklärt werden muß.

Der zweite Gesichtspunkt, nach dem wir den Magensaft einerseits und die Pankreatinlösung andererseits prüften, war die Beeinflussung der lipolytischen Wirksamkeit durch die Reaktion. Nachdem für mehrere Fermente erwiesen war, welch bedeutende Rolle geringe Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration auf die Schnelligkeit der fermentativen Spaltung spielen[1]), erschien es äußerst unwahrscheinlich, daß zwei Organe mit so verschiedener Reaktion, wie Magen und Dünndarm, bezüglich der in beiden nachgewiesenen Fettspaltung auf ein Ferment angewiesen sein sollten.

Für diese Untersuchungsreihe wurde, ganz wie vorher, zunächst in einem Vorversuche diejenige Fermentmenge ermittelt, die den

---

[1]) Für Pepsin siehe Sörensen, diese Zeitschr. 21, 131, 1909, sowie L. Michaelis und H. Davidsohn, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 8, 1910; für Invertin: L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. 35, 386, 1911; für Trypsin: L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. 36, 280, 1911. Siehe ferner die ausgezeichnete Zusammenfassung von S. P. L. Sörensen, Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei biologischen Prozessen. Ergebnisse d. Physiol. von Asher und Spiro XII, 1912.

gewünschten langsamen Verlauf der Oberflächenspannungsveränderung in der Tributyrinlösung aufwies, sodann das Gemisch von der Tributyrinlösung und der im Vorversuch ermittelten Fermentmenge mit verschiedenen Reaktionsregulatoren versetzt und überall in Zwischenräumen von je 20 Minuten die Tropfenzahl bestimmt. Einige Beispiele mögen die Versuchsanordnung und Ergebnisse illustrieren. Versuch 12 bis 15 enthält Untersuchungen mit Magensaft, Versuch 16 bis 18 solche mit Pankreatinlösung. Zum besseren Verständnis der folgenden Tabellen sei noch bemerkt, daß natürlich der gewünschte langsame Verlauf der Tributyrinspaltung nur in einem Röhrchen auftreten kann; die anderen müssen entweder langsamer oder schneller verlaufen. Wir haben es für das Zweckmäßigste gehalten, das günstig verlaufende Röhrchen auf eine mittlere Acidität zu bringen. Daher kommt es z. B., daß das Röhrchen 1 des Versuchs 16, das die optimale Reaktion hat, so schnell verläuft, daß in den ersten 20 Minuten fast die ganze Spaltung erledigt ist. Begreiflicherweise wird es nun allmählich, da es selbst nur noch sehr langsam weiter geht, von dem nächst begünstigten Röhrchen beinahe eingeholt. Der Unterschied in der absoluten Tropfenzahl in den verschiedenen Versuchen ist dadurch zu erklären, daß die Versuche mit verschiedenen Capillaren angestellt wurden. Es sind uns im Laufe der Zeit mehrere zerbrochen und nicht immer durch ganz gleichwertige ersetzt worden.

Versuch 12.

Wasserbad von 19°. Jeder Kolben enthält 60 ccm Tributyrinlösung, 1,0 ccm des fünffach verdünnten Magensaftes sowie den Regulatorzusatz.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min.				[H˙] berechnet
		0	20	40	60	
1	0,05 ccm $^n/_3$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^n/_3$-sek. „	161	152	146	141	$1,0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^n/_3$-prim. „ 0,5 „ $^n/_3$-sek. „	161	145	134	131	$2,0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^n/_3$-prim. „ 0,1 „ $^n/_3$-sek. „	161	147	133	132	$2,0 \times 10^{-6}$
4	0,5 „ $^n/_1$-Essigsäure 0,5 „ $^n/_1$-Natriumacetat	161	151	143	139	$1,8 \times 10^{-5}$
5	1,0 „ $^n/_1$-Essigsäure 0,1 „ $^n/_1$-Natriumacetat	161	152	146	143	$1,8 \times 10^{-4}$

Versuch 13.

Anordnung wie Versuch 12; Magensaft 2,5 fach verdünnt.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min. 0	20	40	60	[H˙] berechnet
1	0,05 ccm $^{n}/_{3}$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	161	150	141	132	$1{,}0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^{n}/_{3}$-prim. „ 0,5 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	161	135	127	124	$2{,}0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^{n}/_{3}$-prim. „ 0,1 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	161	150	148	150	$2{,}0 \times 10^{-6}$

Versuch 14.

Anordnung wie Versuch 12; Magensaft 2,5 fach verdünnt.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min. 0	20	40	60	[H˙] berechnet
1	0,05 ccm $^{n}/_{3}$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	162	151	142	134	$1{,}0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^{n}/_{3}$-prim. „ 0,5 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	162	135	129	126	$2{,}0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^{n}/_{3}$-prim. „ 0,1 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	162	134	128	125	$2{,}0 \times 10^{-6}$
4	0,5 „ $^{n}/_{1}$-Essigsäure 0,5 „ $^{n}/_{1}$-Natriumacetat	162	136	127	125	$1{,}8 \times 10^{-5}$

Versuch 15.

Anordnung wie Versuch 12; Magensaft 3 fach verdünnt.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min. 0	20	40	00	[H˙] berechnet
1	0,05 ccm $^{n}/_{3}$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	162	151	143	130	$1{,}0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^{n}/_{3}$-prim. „ 0,5 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	162	140	124	123	$2{,}0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^{n}/_{3}$-prim. „ 0,1 „ $^{n}/_{3}$-sek. „	162	129	123	123	$2{,}0 \times 10^{-6}$
4	0,5 „ $^{n}/_{1}$-Essigsäure 0,5 „ $^{n}/_{1}$-Natriumacetat	162	143	129	125	$1{,}8 \times 10^{-5}$
5	1,0 „ $^{n}/_{1}$-Essigsäure 0,1 „ $^{n}/_{1}$-Natriumacetat	162	155	147	143	$1{,}8 \times 10^{-4}$

Versuch 16.

Wasserbad von 19°. Jeder Kolben enthält 60 ccm Tributyrinlösung, 1,0 ccm 0,4%ige Pankreatinlösung und den Regulatorzusatz.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min. 0	20	40	60	$[H^{\cdot}]$ berechnet
1	0,05 ccm $^n/_3$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^n/_3$-sek. „	148	120	120	116	$1{,}0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^n/_3$-prim. „ 0,5 „ $^n/_3$-sek. „	148	131	125	120	$2{,}0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^n/_3$-prim. „ 0,1 „ $^n/_3$-sek. „	148	144	138	141	$2{,}0 \times 10^{-6}$
4	0,5 „ $^n/_1$-Essigsäure 0,5 „ $^n/_1$-Natriumacetat	148	146	149	147	$1{,}8 \times 10^{-6}$

Der Versuch, noch stärker alkalische Reaktionen bezüglich ihres Einflusses auf die Lipase der Pankreatinlösung zu prüfen, scheiterte, weil bei solchen Reaktionen eine spontane Spaltung der Tributyrinlösung auftrat. Das in Nr. 1 angewandte Regulatorgemisch zeigte sich dagegen in Kontrollversuchen mit gekochten Pankreatinlösungen indifferent gegenüber dem Tributyrin.

Versuch 17.

Anordnung wie Versuch 16; Pankreatinlösung ist 0,4%ig.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min. 0	20	40	60	$[H^{\cdot}]$ berechnet
1	0,05 ccm $^n/_3$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^n/_3$-sek. „	150	124	119	117	$1{,}0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^n/_3$-prim. „ 0,5 „ $^n/_3$-sek. „	150	133	127	120	$2{,}0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^n/_3$-prim. „ 0,1 „ $^n/_3$-sek. „	150	144	142	140	$2{,}0 \times 10^{-6}$
4	0,5 „ $^n/_1$-Essigsäure 0,5 „ $^n/_1$-Natriumacetat	150	147	148	146	$1{,}8 \times 10^{-6}$

Versuch 18.

Anordnung wie Versuch 16; Pankreatinlösung ist 0,2%ig.

	Regulatorflüssigkeit	Tropfenzahl n. Min. 0	20	40	60	$[H^{\cdot}]$ berechnet
1	0,5 ccm $^n/_3$-prim. Natriumphosphat 1,0 „ $^n/_3$-sek. „	160	143	134	128	$1{,}0 \times 10^{-8}$
2	0,5 „ $^n/_3$-prim. „ 0,5 „ $^n/_3$-sek. „	160	146	141	135	$2{,}0 \times 10^{-7}$
3	1,0 „ $^n/_3$-prim. „ 0,1 „ $^n/_3$-sek. „	160	155	148	148	$2{,}0 \times 10^{-6}$

Wiederholt angestellte Messungen mit Konzentrationsketten haben uns überzeugt, daß die tatsächlich vorhandene Wasserstoffionenkonzentration gut übereinstimmt mit der aus den Reaktionsregulatoren berechneten.

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß die Lipase der Pankreatinlösung ein Optimum ihrer Wirksamkeit bei einer [H˙] von $1,0 \times 10^{-8}$ hat; dieser Wert ist fast identisch mit demjenigen, den Michaelis und ich[1]) vor kurzem als Optimum für die Trypsinwirkung, [H˙] $= 2,1 \times 10^{-8}$, festgestellt haben. Man wird wohl nicht fehlgehen, wenn man vermutet, daß die sog. schwach alkalische Reaktion des Dünndarminhalts[2]) mit dieser Reaktion übereinstimmen wird. Wenn diese Vermutung sich bestätigt, so würde die tryptische und lipolytische Fermentwirkung des Darmes ebenso wie die peptische des Magens physiologischerweise unter optimalen Bedingungen vor sich gehen.

Beim Magensaft findet sich ein Optimum der Lipasenwirkung bei einer [H˙] von etwa $2,0 \times 10^{-6}$. Zwischen der optimalen Reaktion der Lipase im Magensaft und der in der Pankreatinlösung findet sich also eine Differenz, die weit größer ist als die Fehlerquelle der angewendeten Methode.

Bei beiden Fermenten zeigt sich in der Zone der nicht optimalen [H˙] sowohl bei stärker saurer wie alkalischer Reaktion eine erhebliche Verlangsamung des Prozesses. Es wäre interessant zu prüfen, ob die Geschwindigkeit des fermentativen Vorganges, als Funktion der [H˙] graphisch dargestellt, ebenso wie Michaelis und ich es für das Invertin[3]) und Trypsin[1]) gezeigt haben, die Form der Dissoziationsrest- oder der Dissoziationskurve einer schwachen Säure annehmen würde. Die bisher beigebrachten Werte lassen das vermuten. Schließlich erscheint mir noch der Umstand erwähnenswert, daß das Optimum der Magenlipase sehr verschieden ist von dem des wichtigsten Magenferments, des Pepsins. Nach den Untersuchungen von Sörensen[4])

---

[1]) L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. 36, 280, 1911.

[2]) Die Reaktion des Dünndarminhalts ist natürlich nicht zu identifizieren mit der Reaktion des Pankreas- oder Darmsaftes, welche nach Foà (Archivio di Fisiologia 3, 369, 1906; zit. nach Sörensen) beim Hunde eine [H˙] von 5 bis 11×10^{-10} besitzen.

[3]) Dieselben, ibidem 35, 386, 1911.

[4]) Sörensen, ibidem 21, 131, 1909.

sowie von Michaelis und mir[1]) ist eine [H˙] von $1,6 \times 10^{-2}$ als optimal für das Pepsin anzusehen. Die innere Zweckmäßigkeit dieses Unterschiedes in der optimalen Reaktion von Pepsin und Magenlipase läßt sich vor der Hand nicht erklären; wir kennen aber Tatsachen, die zeigen, daß beim Ablauf der Magenverdauung diesem Umstand Rechnung getragen wird. Es kann nämlich durch eine ganze Anzahl von Beobachtungen als festgestellt gelten, daß der Mageninhalt nach einer fettreichen Nahrung eine viel schwächer saure Reaktion aufweist als gewöhnlich. So zeigen beispielsweise meine Versuche am Erwachsenen[2]) nach einem Milchprobefrühstück in der Regel Aciditäten zwischen [H˙] = 1×10^{-5} und 1×10^{-4} gegenüber einer [H˙] von 1×10^{-2} nach gewöhnlichem Ewaldschen Probefrühstück und Probemittagessen. Eine noch größere Rolle spielt diese Frage aber, wie leicht begreiflich, für die Magenverdauung des Säuglings. Hier haben die Versuche von Allaria[3]), mir[4]) und Salge[5]) in allen Fällen eine Acidität von durchschnittlich 1×10^{-5} ergeben.

Man darf vielleicht vermuten, daß die Bedeutung dieser Tatsache in Zusammenhang steht mit der oben gekennzeichneten Differenz in der optimalen Reaktion der Magenlipase und des Pepsins, und daß beide Befunde darauf hindeuten, daß nach einer fettreichen Mahlzeit die Fettspaltung im Magen auf Kosten der Pepsinverdauung begünstigt wird. Im Einklang mit dieser Auffassung steht die Beobachtung von Sedgwick[6]), daß die Fettspaltung bei dem obligat fettreich ernährten Säugling weiter als gewöhnlich (bis zu 25%) geht. Sollte ferner die Existenz der von manchen Autoren[7]) postulierten Casease oder die Richtigkeit der Versuche van Dams[8]) über die Caseinspaltung durch Chymosin bei einer für die peptische Ver-

---

[1]) L. Michaelis und H. Davidsohn, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 8, 1910.

[2]) H. Davidsohn, Zeitschr. f. Kinderheilk. 4, 208, 1912.

[3]) Allaria, Jahrb. f. Kinderheilk. 67, Erg.-Heft, 123, 1908.

[4]) H. Davidsohn, Zeitschr. f. Kinderheilk. 2, 420, 1911.

[5]) Salge, ibidem 4, 171, 1912.

[6]) Sedgwick, Jahrb. f. Kinderheilk. 64, 194, 1906.

[7]) Vgl. darüber Schloßmann und Engel, Handbuch der Biochemie III, 1. Hälfte, 1910.

[8]) van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 61, 147, 1909.

dauung ungünstigen Acidität sichergestellt werden können, so würde eine peptische Verdauung bei der Ernährung mit Milch überhaupt überflüssig sein.

Zusammenfassung.

Die von Izar zum Studium der Lipolyse empfohlene Methode, bei der die Oberflächenspannung künstlich hergestellter Emulsionen mit der stalagmometrischen Methode geprüft und beobachtet wird, hat sich bei der Nachprüfung als nicht brauchbar erwiesen.

Bei der Prüfung der spaltenden Fähigkeit der Lipase in Magensaft und Pankreasextrakt gegenüber einer gesättigten wässerigen Tributyrinlösung mit Hilfe der stalagmometrischen Methode unter wechselnden Bedingungen ergibt sich, daß die Pankreaslipase dem reaktionshemmenden Einfluß von Natriumfluorid gegenüber viel empfindlicher ist als die Magenlipase, und daß das Reaktionsoptimum der Pankreaslipase bei etwa $1{,}0 \times 10^{-8}$ liegt, während das der Magenlipase sich bei etwa $2{,}0 \times 10^{-6}$ befindet. Auf beide Arten ist es also gelungen, eine Verschiedenheit in den Eigenschaften der untersuchten Fermente festzustellen, so daß die Annahme einer eigenen Magenlipase als durchaus berechtigt erscheint.

Über die Formaldehydhämolyse.

Von

Philipp Eisenberg.

(Aus dem k. k. hygienischen Institut der Jag. Universität zu Krakau.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Beim Studium der Einwirkung von Fixationsmitteln auf Säugetiererythrocyten habe ich einige bemerkenswerte Erscheinnngen festgestellt, deren kurze Mitteilung hier erfolgen soll. Nach den Untersuchungen von Noguchi sowie von Guyot gelingt es durch Formalinhärtung, Blutkörperchen der Wasserhämolyse unzugänglich zu machen und können derartig präparierte Erythrocyten mittels verschiedener Hämagglutinine zur Verklumpung gebracht werden. Ja noch mehr, Armand-Delille und Launoy geben neuerdings an, daß man mittels ganz schwacher (2 bis 5‰) Formalinlösungen Blutkörperchen derart konservieren kann, daß sie noch nach Wochen sich zur Anstellung von hämolytischen Versuchen eignen.

Führt man nun solche Versuche, deren Richtigkeit ohne weiteres festgestellt werden kann, unter Berücksichtigung des zeitlichen Moments aus, d. h. sucht man den Zeitpunkt festzulegen, in dem die Fixierung durch das Formaldehyd eintritt, so stößt man auf ein paradoxes Phänomen, indem die betreffenden Blutaufschwemmungen innerhalb eines gewissen Zeitraumes nach dem Formalinzusatz osmotisch nicht nur nicht resistenter sondern im Gegensatz labiler sich erweisen, als unvorbehandelte Blutkörperchen. Es kamen in meinen Versuchen frische 5 bis 7%ige Aufschwemmungen verschiedener Blutkörperchen (von

Mensch, Pferd, Rind, Hammel, Ziege, Kaninchen, Meerschweinchen und Taube, frisch gewaschen) in 0,85%iger Kochsalzlösung, der Formaldehyd kam in Form von Scheringschem Formalin (Formaldehyd von Kahlbaum sowie von Noerdlinger gaben identische Resultate) zur Verwendung, die Zusätze sind immer auf Formaldehydgehalt berechnet. Der Formaldehydzusatz ist nun für Erythrocyten durchaus nicht irrelevant, indem von 8% aufwärts totale Hämolyse (mit nachfolgender Niederschlagsbildung) erfolgt, bei niedrigeren Konzentrationen ein geringer Hämoglobinaustritt beobachtet wird, der über den abgesetzten Blutkörperchen eine mehr oder weniger tingierte Flüssigkeit erscheinen läßt. Der Blutkörperchenbrei wird stark klebrig, das Hämoglobin mit je nach der Konzentration des Formaldehyds steigender Schnelligkeit in Methämoglobin umgewandelt.

Die osmotische Resistenzprüfung wurde in der Weise vorgenommen, daß zu 0,2 ccm der Erythrocytenaufschwemmung wechselnde Mengen von destilliertem Wasser zugesetzt wurden und jede Probe mit isotonischer Kochsalzlösung auf das Gesamtvolumen von 1 ccm aufgefüllt wurde. Die betreffende Blutaufschwemmung wurde durch Formalinzusatz auf die gewünschte Formaldehydkonzentration gebracht und nach verschieden langem Aufenthalt bei Zimmertemperatur auf die osmotische Resistenz geprüft. Als Kontrolle diente die Resistenzprüfung der ursprünglichen formaldehydfreien Aufschwemmung. Die Resultate wurden nach 1 stündigem Verweilen im Brutschrank sowie nach 20 stündigem Aufenthalt in Zimmertemperatur abgelesen.

Als typisches Beispiel des zeitlichen Verlaufs der Formaldehydwirkung sei nebenstehende Versuchsreihe mit Meerschweinchenerythrocyten wiedergegeben.

Die nähere Analyse des hier dargestellten Versuchs ergibt folgendes: Unter Formaldehydeinwirkung erfährt zunächst die osmotische Resistenz der Erythrozyten eine starke Abnahme — desto ausgesprochener, je höher die Konzentration des Formaldehydzusatzes gewählt wird. Diese Resistenzerniedrigung macht nach Ablauf einer gewissen Zeit einer absoluten Unempfindlichkeit Platz, und zwar tritt dieser Umschlag desto früher ein, je höher die Formaldehydkonzentration — bei 5% macht er

Tabelle I.

6,6 %ige gewaschene Aufschwemmung von frischen Meerschweinchenerythrocyten. Dieselbe mit 0,5 %, 1,0 %, 2,0 % und 5,0 % Formaldehyd versetzt und nach 1/2-, 1 1/2-, 3-, 7- und 26stündigem Aufenthalt in Zimmertemperatur auf osmotische Resistenz geprüft. Als Kontrolle Prüfung der formaldehydfreien Aufschwemmung. Resultat abgelesen nach 1 Stunde bei 37° und nach 20stündigem Aufenthalt in Zimmertemperatur.

Zeichenerklärung: + vollständige Hämolyse, +? eben vollständige, ⧺ fast vollständige, ♐ starke, ± teilweise, ∓ schwache, $\overline{\mp}$ Spur Hämolyse, −? Spürchen, − keine Hämolyse.

		Röhrchen Nr.					
		1	2	3	4	5	6
enthält:	destilliertes H_2O . .	0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,8
	isoton. NaCl-Lösung .	0,0	0,7	0,6	0,5	0,3	0
	Erythrocytenaufschw.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
nach 1/2 Std. Zeit	0,5 % Formaldehyd	$\overline{\mp}$	⧺	+	+	+	+
	1 % "	+?	+	+	+	+	+
	2 % "	+	+	+	+	+	+
	5 % "	♐	♐	♐	♐	♐	♐
nach 1 1/2 Std. Zeit	0,5 % "	$\overline{\mp}$	±	+	+	+	+
	1 % "	⧺	+	+	+	+	+
	2 % "	+	+	+	+	+	+
	5 % "	−	−	−	−	−	−
nach 3 Std. Zeit	0,5 % "	$\overline{\mp}$	♐	+	+	+	+
	1 % "	+?	+	+	+	+	+
	2 % "	+	+	+	+	+	+
	5 % "	−	−	−	−	−	−
nach 7 Std. Zeit	0,5 % "	⧺	+	+	+	+	+
	1 % "	+	+	+	+	+	+
	2 % "	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$
	5 % "	−	−	−	−	−	−
nach 26 Std. Zeit	0,5 % "	∓	∓	∓	∓	∓	∓
	1 % "	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$
	2 % "	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$
	5 % "	−	−	−	−	−	−
Kontrolle	ohne Formaldehyd	−	−	−	−	−	+

sich bereits nach 1/2 Stunde in der nicht mehr vollkommenen Hämolyse als Interferenzerscheinung bemerkbar und ist nach 1 1/2 Stunden bereits voll ausgesprochen, bei 2 % nach 7 Stunden,

bei 1 % nach 26 Stunden und bei 0,5 % ist noch ein Rest der herabgesetzten Resistenz in der teilweisen Hämolyse nach 26 Stunden bemerkbar. Dieser typische Verlauf war mit unwesentlichen zeitlichen Variationen bei allen oben genannten Blutkörperchenarten festzustellen.

Noch ein weiteres, anscheinend paradoxes Phänomen ist der Lektüre der Tabelle I zu entnehmen. Im Stadium der Resistenzherabsetzung tritt nämlich Hämolyse nicht nur auf Wasserzusatz (Röhrchen 2 bis 6) ein, sondern auch in Röhrchen 1, wo die mit Formaldehyd behandelten Blutkörperchen mit isotonischer NaCl-Lösung versetzt werden. Wird die Aufschwemmung sich selbst überlassen, wo die Blutkörperchen doch auch im isotonischem Medium sich befinden, so findet keine oder höchstens schwache Hämolyse statt (wie übrigens aus den weiteren Prüfungen derselben Aufschwemmung ersichtlich ist), wird NaCl-Lösung zugesetzt, so tritt starke bis vollständige Hämolyse ein. Die Erscheinung wird dadurch noch merkwürdiger, daß auch die Menge der zugesetzten isotonischen Kochsalzlösung für die Größe des hämolytischen Effektes von entscheidender Bedeutung ist. Versetzt man eine gewisse Menge formalinisierter Blutaufschwemmung im Stadium der verminderten Resistenz mit steigenden Mengen Kochsalzlösung, so bekommt man (speziell bei schwächeren Formaldehydzusätzen) desto stärkere Hämolyse, je mehr NaCl-Lösung zugesetzt wurde. Das ist sehr deutlich aus den Kolonnen A und C der Tabelle III bei 1 % und 2 % Formaldehydzusatz zu ersehen. Es ergibt sich daraus, daß die Isotonie der mit Formaldehyd versetzten Blutkörperchen im Stadium der Resistenzherabsetzung eine Steigerung erfährt, indem die sonst indifferente isotonische NaCl-Lösung nunmehr Hämolyse eintreten läßt. Man müßte demnach durch Benutzung einer höher konzentrierten NaCl-Lösung die Hämolyse hintanhalten können, eine Voraussetzung, die im Versuch eine Bestätigung erfährt (Tabelle II).

Wir ersehen aus der Tabelle, daß tatsächlich in einem Milieu von höherem osmotischen Druck die Hämolyse ganz zurückgedrängt wird und daß diese Konzentration um so höher sein muß, je größer der Formaldehydzusatz. Bei ganz hohen Formaldehydzusätzen (12 %) bleiben auch große Salzkonzen-

Tabelle II.

Versuchsanordnung wie in Tabelle I.

		Röhrchen Nr.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
enthält:	destilliertes H_2O . .	0,3	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0	0
	10 %ige NaCl-Lösung	0	0	0	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
	isoton. NaCl-Lösung .	0,5	0,6	0,7	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2
	Erythrozytenaufschw.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Meerschweinch.-Erythrocyt.	2 % Formaldehyd	+	+	#	#	⩱	—	—	—	—	—
	4 % „	+	+	+	+	#	∓	⩱	⩱	⩱	⩱
Kaninchen-Erythrocyt.	2 % „	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	4 % „	+	+	+	+	+	∓	⩱	—	—	—

trationen ohne Einfluß. Andere Neutralsalze (LiCl, $CaCl_2$) hemmen ebenfalls die Formaldehydhämolyse.

Andererseits konnte gezeigt werden, daß diese hemmende Wirkung sich nur auf den Vorgang der Hämolyse erstreckt, daß dagegen die Anwesenheit des Salzes in höherer Konzentration die eigentliche Beeinflussung der Erythrocyten durch das Formaldehyd in keiner Weise hindert. Versetzt man nämlich eine Erythrocytenaufschwemmung in 8 bis 12 %iger NaCl-Lösung mit 2 bis 4 % Formaldehyd und verdünnt sie nach 5 bis 10 Minuten langem Kontakt mit isotonischer NaCl-Lösung oder Wasser derart, daß eine ca. 1 %ige NaCl-Lösung resultiert, so erfolgt fast momentane Hämolyse. Die Formaldehydwirkung kann hier nicht erst nach dem Verdünnen eingetreten sein, denn eine 0,2 %ige Formaldehydlösung, wie sie jetzt vorhanden ist, bewirkt überhaupt keine Hämolyse oder höchstens Spuren nach längerer Zeit. Man kann dies auch direkt dadurch beweisen, daß man das mit 12 % NaCl und 3,5 % Formaldehyd versetzte Blut nach 5 Minuten langem Kontakt zentrifugiert und die obere Flüssigkeit durch isotonische NaCl-Lösung ersetzt; es erfolgt dann prompte (fast sofortige) Hämolyse bei Abwesenheit von freiem Formaldehyd. Es wird auf diese Weise der Vorgang der Formaldehydhämolyse in zwei unabhängige Teilvorgänge zerlegt, die Beeinflussung der Erythrocyten und den Hämoglobinaustritt, von denen jeder besondere Bedingungen zu seinem Eintritt erfordert.

Die Wirkung der höheren NaCl-Konzentrationen auf die Formaldehydhämolyse ist aber noch eigenartiger, es wird nämlich die Beeinflussung der Erythrocyten nicht nur nicht behindert, sondern sogar beschleunigt und erhöht. In Gegenwart höherer NaCl-Konzentrationen tritt die Resistenzerniedrigung früher und in höherem Grade ein, und ebenso wird das Stadium der darauffolgenden Fixation schneller erreicht. In Tabelle III tritt dies beim Vergleich der Kolonne A und C deutlich zutage. Bei 4%igem Formaldehydzusatz befindet sich die normale Blutaufschwemmung nach 15 Minuten noch in voller Resistenzherabsetzung, die mit 12% NaCl versetzte ist nach dieser Zeit bereits fixiert. Ebenso verhalten sich die mit 2% Formaldehyd behandelten Erythrocyten nach 1 Stunde. Umgekehrt ist bei schwachem (1%igem) Zusatz von Formaldehyd die 12%ige NaCl-Aufschwemmung nach 15 Minuten bereits sehr empfindlich, während die normale dies erst nach 1 Stunde (in schwächerem Grade) wird; nach 5 Stunden ist die erste bereits fixiert, die zweite noch nicht ganz.

Tabelle III.

Es wurden folgende 9 Röhrchen angestellt:

	Formaldehyd 10%	isotonische NaCl-Lösg.	30%ige NaCl-Lösg.	50%ige Hammelblutaufschwemmg.
A 1, B 1	1,2 ccm (4%)	1,5 ccm	0 ccm	0,3 ccm
A 1, B 2	0,6 „ (2%)	2,1 „	0 „	0,3 „
A 3, B 3	0,3 „ (1%)	2,4 „	0 „	0,3 „
C 1	1,2 „ (4%)	0,3 „	1,2 „	0,3 „
C 2	0,6 „ (2%)	0,9 „	1,2 „	0,3 „
C 3	0,3 „ (1%)	1,2 „	1,2 „	0,3 „

Nach 15 Minuten, 1 Stunde und 5 Stundem langem Aufenthalt der Röhrchen bei Zimmertemperatur werden jedem Röhrchen der Reihen A und C 5 mal 0,2 ccm entnommen und mit 0, resp. 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ccm isoton. NaCl-Lösung versetzt. Die Resultate sind nach 9stündigem Aufenthalt der Proben bei Zimmertemperatur verzeichnet. In der Reihe B wurde den Röhrchen nach 15 Minuten und 5 Stunden je 1 ccm entnommen, zentrifugiert, die obere Flüssigkeit abgegossen, der Bodensatz in 1 ccm isoton. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und nun je 0,2 ccm dieser Aufschwemmung mit 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ccm isoton. NaCl-Lösung versetzt. Folgen die Resultate nach 9 Stunden:

Nr.	Nach	A					B					C				
		0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2	0,4	0,6	0,8
1	15′	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
	1h	–	–	–	–	–	–?	–?	–?	–?	–?	–	–	–	–	–
	5h	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	15′	–	♐	#	+?	+?	+?	+?	+?	+?	+?	–	–?	∓	+?	+?
	1h	–	♐	+?	+?	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
	5h	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	15′	–	–?	∓	∓	∓	±	±	±	±	±	–?	±	♐	#	+?
	1h	–	∓	∓	±	♐	±	±	♐	♐	♐	–?	∓	∓	∓	∓
	5h	–	–	–?	∓	∓	–?	–?	–?	–?	–?	–?	–?	–	–	–

Die Verstärkung der Formaldehydwirkung durch höhere NaCl-Konzentrationen ergibt sich auch aus folgendem Versuche, wo an sich unwirksame, schwache Formaldehydzusätze durch starke NaCl-Konzentrationen wirksam gemacht werden.

Tabelle IIIa.

Es werden folgende 6 Röhrchen angestellt:

	Formaldehyd 2,5%	NaCl-Lösung 30%	Isoton. NaCl-Lösung	50%ige Hammelblutaufschw.
A 1	0,8 (1%)	0,8	0,2	0,2
B 1	0,8 (1%)	0	1,0	0,2
A 2	0,4 (0,5%)	0,8	0,6	0,2
B 2	0,4 (0,5%)	0	1,4	0,2
C 1	0,2 (0,25%)	0,8	0,8	0,2
C 2	0,2 (0,25%)	0	1,6	0,2

Nach 3, 10 und 60 Minuten langem Aufenthalt bei Zimmertemperatur werden jedem Röhrchen dreimal 0,2 ccm entnommen und mit 0,2, 0,4, 0,8 ccm isoton. NaCl-Lösung versetzt. Folgen die Resultate dieser Proben nach 20stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur:

Formaldehydgehalt urspr.	NaCl-Gehalt urspr.	Röhrchen Nr.	Nach 3′ +			Nach 10′ +			Nach 60′ +		
			0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
1%	12%	A 1	±	♐	+?	∓	♐	+	–?	–?	–?
	isot.	B 1	∓	±	#	∓	±	#	#	+?	+
0,5%	12%	A 2	∓	±	#	±	#	+?	±	±	♐
	isot.	B 2	–	–?	–?	–	–?	∓	–?	–?	∓
0,25%	12%	A 3	∓	±	♐	±	♐	#	±	♐	+?
	isot.	B 3	–	–	–	–	–	–	–	–	–?

Es bleibt nun aber noch die auffallende Tatsache zu erklären, warum die mit Formaldehyd versetzten Erythrocyten auf Zusatz von isotonischer Kochsalzlösung ihr Hämoglobin austreten lassen, während sie sich selbst (in einem Milieu von derselben osmotischen Konzentration) überlassen der Hämolyse entgehen. Es könnte hier zunächst die Vermutung aufkommen, daß die erhöhte Temperatur, bei der die Resistenzprüfung vorgenommen wird, die Hämolyse der empfindlich gewordenen Blutkörperchen verursacht, während die bei Zimmertemperatur belassene Aufschwemmung davon verschont bleibt. Dieser Annahme wiederspricht jedoch das Experiment, das zeigt, daß auch bei erhöhter Temperatur (selbst bei 44°) die ohne weiteren Zusatz von isotonischer Kochsalzlösung belassene formalinisierte Erythrocytenaufschwemmung intakt bleibt und nur nach Zusatz von Kochsalzlösung das Hämoglobin austreten läßt, andererseits geht die Formaldehydhämolyse bei Zimmertemperatur ebenso gut vonstatten, wie bei 43°. Die anscheinend naheliegende Vermutung, daß die empfindlich gewordenen Blutkörperchen unter Kochsalzeinwirkung hämolysiert werden, wird durch die oben wiedergegebenen Versuche entkräftet, in denen gerade durch erhöhte Kochsalzkonzentration die Hämolyse der formalinisierten Blutkörperchen hintangehalten wird.

Die wahrscheinlichste Erklärung, die sich aus meinen Versuchen ergibt, ist die folgende: Die Einwirkung des Formaldehyds auf das Blutkörperchen ist zweifacher Natur: es wirkt auf das Protoplasma des Stromas und wandelt das Hämoglobin zu Methämoglobin um. Bei der Einwirkung auf die Eiweißkörper entsteht vielleicht als Zwischenstufe bei der Bildung der Methylen-Eiweißverbindung ein Produkt von erhöhter Quellbarkeit. (Damit stimmt überein, daß nach eingetretener Hämolyse die ganze Blutprobe, speziell bei größerer Blutkonzentration, gelatiniert.) Die erhöhte Wasseranziehungskraft dieses Produktes bringt es mit sich, daß in diesem Stadium auch die sonst isotonische Kochsalzlösung nicht mehr isotonisch ist und unter Umständen genügend Wasser an das Blutkörperchen abgeben kann, damit Hämolyse eintritt. Ob es zur Hämolyse kommt, hängt zunächst von der Kochsalzkonzentration des Milieus ab, indem die Wasseranziehungskraft (der Haftdruck) des Salzes derjenigen des Stromas entgegenwirkt. Zur Erklärung der Tat-

sache, daß das sich selber überlassene Formolblut intakt bleibt, bei NaCl-Zusatz aber gelöst wird, könnte man dann die an sich wenig wahrscheinliche Annahme heranziehen, daß der Hämoglobinaustritt auch von der relativen Flüssigkeitsmenge bedingt wird, d. h. von der Anzahl von Wassermolekülen, die jeder einzelne Erythrocyt disponibel findet. In der formalinisierten Aufschwemmung wäre dann die Konkurrenz der Blutkörperchen um die relativ geringe Wassermenge zu groß, und sie blieben daher intakt; setzt man weiter Kochsalzlösung dazu, so könnten sie nun genügend Wasser anziehen und gingen in Lösung.

Es fragt sich nun, ob auch die Wasserhämolyse normaler Erythrocyten (denn als solche ist wohl am besten die Hämolyse der formalinisierten Blutkörperchen zu betrachten) nicht nur von der osmotischen Valenz des Milieus, sondern auch von den relativen Mengenverhältnissen zwischen Blutkörperchen und Milieu bestimmt wird. Wäre dies der Fall, so müßten bei der Resistenzprüfung verschieden konzentrierte Blutkörperchenaufschwemmungen verschiedene Grenzwerte ergeben, d. h. es müßten verdünntere Aufschwemmungen in konzentrierteren Kochsalzlösungen hämolysiert werden als dichtere, und es müßte eine Kochsalzkonzentration gefunden werden, in der wohl verdünnte, nicht aber dichte Aufschwemmungen gelöst würden. Meine zahlreichen Versuche in dieser Richtung ergaben entweder gar keine oder nur geringe Ausschläge, so daß ich die Frage wohl in negativem Sinne entscheiden muß.

Daß bei der Einwirkung des Formaldehyds auf Erythrocyten nicht die absoluten Mengen der reagierenden Substanzen, sondern ihre relativen Massenverhältnisse maßgebend sind, lehrt folgender Versuch, der einem älteren Bordetschen Versuche mit Serumhämolysinen nachgebildet ist. Man versetzt in zwei Röhrchen, *a* und *b*, je 0,1 ccm 33%iger Erythrocytenaufschwemmung (vom Hammel) mit 0,3, resp. 2,3 ccm isotonischer NaCl-Lösung, setzt sodann 0,1 ccm 10%iger Formaldehydlösung hinzu. Nach 5 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur werden zum Röhrchen *a*, das nur 0,3 ccm NaCl-Lösung erhalten hatte, weitere 2 ccm davon zugesetzt und auf diese Weise das Volumen beider Proben ausgeglichen. Die Folge davon ist sofortige komplette Hämolyse im Röhrchen *a*, während das Röhrchen *b* auch nach Stunden keine Spur davon aufweist.

Ähnliche Versuche habe ich mit gleichem Erfolge auch mit vielen anderen hämolytisch wirksamen Stoffen ausgeführt, worüber in anderem Zusammenhang eingehender berichtet werden soll. Diese Versuche beweisen, daß die gleichen absoluten Mengen der reagierenden Stoffe in kleinerem Volumen bei innigerem Kontakt intensiver aufeinander einwirken — sodann aber, daß die Einwirkung bereits binnen 5 Minuten vollzogen ist.

Diese letztere Tatsache konnte ich auch auf eine andere Weise feststellen, wie folgender Versuch beweist.

Tabelle IV.

Je 0,5 ccm 13,2%iger Hammelblutaufschwemmung werden mit je 0,5 ccm 16, 8, 4, 2%iger isotonischer Formaldehydlösung versetzt, nach 5 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur werden alle vier Proben zentrifugiert, die klare, obenstehende Flüssigkeit abgegossen und durch isotonische NaCl-Lösung ersetzt. Von den resultierenden vier Aufschwemmungen werden je 0,2 ccm mit 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ccm NaCl-Lösung versetzt und das hämolytische Resultat nach 13stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur abgelesen.

0,2 ccm Blutaufschwemmung mit Formaldehydgehalt	+ NaCl-Lösung				
	0	0,2	0,4	0,6	0,8
8%	+?	+?	+??	+	+
4%	#	#	+?	+?	+?
2%	±	±	#	#	#
1%	∓	∓	∓	∓	∓

Es hat also der Formaldehyd bereits während der kurzen Zeit Gelegenheit gefunden, auf die Erythrocyten einzuwirken, resp. von ihnen gebunden zu werden — in den niederen Konzentrationen ist das hämolytische Resultat freilich schwächer, als es sonst (ohne Auswaschen) zu sein pflegt. Hier müßte wahrscheinlich der Kontakt länger ausgedehnt werden, um das volle Resultat zu erlangen. Wir haben hier wieder in anderer Weise eine Dissoziation der beiden oben erwähnten Teilvorgänge der Formaldehydhämolyse bewirkt, und zwar in der Weise, daß der Hämoglobinaustritt ohne Anwesenheit von freiem hämolytischem Agens vor sich geht (das gelingt auch bei vielen anderen Hämolyticis).

Ich habe weiter versucht, den ganz eigenartigen Charakter der Formaldehydhämolyse noch weiter zu analysieren, indem ich von der schon ausgesprochenen Voraussetzung ausging, daß

hier eine besondere Kombination von fällender (konservierender) und hämolytischer Wirkung vorliegt. Die formolierte Blutaufschwemmung bleibt, sich selbst überlassen, intakt; wird sie verdünnt, so geht sie in Lösung. Bei Betrachtung dieses Vorganges drängt sich unwillkürlich die Vermutung auf, daß in der Aufschwemmung irgendein hemmendes Agens vorhanden ist, dessen Wirksamkeit durch die Verdünnung aufgehoben wird, so daß die bereits präparierten Erythrocyten nunmehr unbehindert sich auflösen können. Ein Detail des in Tabelle IV wiedergegebenen Versuches bekräftigt diese Vermutung; wir sehen, daß die auf ihr ursprüngliches Volumen mit isotonischer NaCl-Lösung ergänzten Bodensätze ohne Volumvermehrung Hämolyse aufweisen, was sonst in der nicht zentrifugierten Aufschwemmung nicht vorkommt (die mit 0 bezeichneten Röhrchen). In demselben Sinne spricht der Vergleich der Kolonnen A und B in Tabelle III, speziell der 0-Röhrchen; in der A-Reihe weisen diese Röhrchen keine Hämolyse auf, in der B-Reihe ist sie mehr oder weniger ausgesprochen und tritt momentan beim Aufschwemmen der Bodensätze in isotonischer NaCl-Lösung auf. Es macht den Eindruck, als ob die präparierten Erythrocyten nur auf die Entfernung des hemmenden Agens gewartet hätten, um in Lösung zu gehen.

Noch ein anderer Zug charakterisiert diese Hämolyse nach Entfernung des hemmenden Agens; während in den Reihen A und C mit steigendem Zusatze von isotonischer NaCl-Lösung auch der hämolytische Effekt gesteigert wird (bei 1 °/₀ und 2 °/₀ Formaldehyd), ist an den aufgeschwemmten Bodensätzen diese Erscheinung nur mehr spurweise zu finden (Tabelle III und IV). Das stimmt ja auch zu unserer Voraussetzung — an der formolisierten Aufschwemmung wird durch die steigende Verdünnung die Hemmung ausgeschaltet, bei den abzentrifugierten Bodensätzen ist das hemmende Agens mechanisch entfernt, hier kann also die nachträgliche Verdünnung nichts mehr ausrichten.

Um die Hypothese von dem hemmenden Agens noch weiter auf ihre Stichhaltigkeit zu prüfen, stellte ich einen Versuch in der Weise an, daß eine formolisierte Blutaufschwemmung, in der 4 °/₀ Formaldehyd auf die Erythrocyten 7 Minuten lang eingewirkt haben, zentrifugiert wurde. Es wurde sodann der Bodensatz zur Hälfte in isotonischer NaCl-Lösung, zur Hälfte

aber in der entsprechenden Menge der abgehobenen oberen Flüssigkeit aufgeschwemmt — das erste Röhrchen zeigte momentane Hämolyse, das zweite gar keine. Dieser Versuch beweist, daß nicht der Prozeß des Zentrifugierens, der doch einen mechanischen Insult bedeutet, für die Hämolyse des in NaCl-Lösung aufgeschwemmten Bodensatzes verantwortlich zu machen ist, denn in Gegenwart des hemmenden Agens bleibt das Zentrifugat intakt. Bezüglich der Natur dieses Hemmungsstoffes könnten drei Hypothesen aufgestellt werden. Entweder ist es das frei gebliebene (nicht gebundene oder durch die Reaktion nicht verbrauchte?) Formaldehyd, das die Hämolyse der von ihm selbst beeinflußten Erythrocyten hemmt, oder aber es entsteht aus ihm bei der Reaktion mit den Erythrocyten ein hemmendes Derivat, oder aber es entsteht aus dem Erythrocytenbestand ein solcher Körper, der in das Medium austritt. Sicher ist, daß der Hemmungskörper nicht in den formolisierten Erythrocyten enthalten ist — werden sie doch in geeignetem (vom Hemmungskörper befreiten oder daran verarmten) Medium prompt gelöst. Auch kann man sich direkt davon überzeugen, wenn man eine formolisierte Blutaufschwemmung zentrifugiert und den Bodensatz in NaCl-Lösung aufschwemmt, wobei er hämolysiert wird; die auf diese Weise erhaltene Lösung der formolysierten Blutkörperchen stört nun in keiner Weise die Hämolyse frischer, mit Formaldehyd versetzter Erythrocyten. Welche von den drei oben namhaft gemachten Möglichkeiten tatsächlich zutrifft, konnte ich bis jetzt nicht entscheiden. Für die Annahme, die wohl etwas eigentümlich klingt, daß das Formaldehyd seine eigene hämolytische Funktion hemmt, sprechen Versuche, die zeigen, daß tatsächlich reines, frisches Formaldehyd die Formaldehydhämolyse hemmt.

Es ergibt sich aus dem angeführten Versuch, daß eine Hemmung der Formaldehydhämolyse durch das Formaldehyd selbst tatsächlich möglich ist. Sodann aber ist daraus ersichtlich, daß es für diese Hemmung keinen konstanten Grenzwert des Formaldehydgehaltes gibt, sondern daß je stärker die ursprüngliche Formaldehydkonzentration war, desto stärker auch die nachträglich zugesetzte sein muß, um Hämolyse zu verhüten, d. h. daß jedem Beeinflussungsgrad ein entsprechender Hemmungsgrenzwert entspricht.

Tabelle V.

Eine 5 %ige Hammelblutaufschwemmung wird in vier Röhrchen A, B, C und D mit 8, resp. 4, 2 und 1 %igem Formaldehyd versetzt; dem Röhrchen A werden nach 2 Minuten (bei Zimmertemperatur), dem Röhrchen B nach 7 Minuten, dem Röhrchen C nach 20 Minuten, dem Röhrchen D nach $1\frac{1}{2}$ Stunden 8 mal 0,2 ccm entnommen und mit 0,8 ccm 4, 2, 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ %iger Formaldehydlösung (isotonisch) resp. mit 0,8 ccm isotonischer NaCl-Lösung versetzt. Es folgen die Resultate dieser Proben nach 6 stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur.

Formaldehydgehalt urspr. %	Entnahme nach	0,2 ccm Gemisch + 0,8 ccm isot. NaCl-Lösg. mit Formaldehydgehalt								0,2 ccm Gemisch ohne Zusatz
		4 %	2 %	1 %	$\frac{1}{2}$ %	$\frac{1}{4}$ %	$\frac{1}{8}$ %	$\frac{1}{16}$ %	0	
8	2′	↗	+?	+	+	+	+	+	+	∓
4	7′	—	—?	#	+	+	+	+	+	—
2	20′	—	—	—	∓	±	↗	#	+?	—
1	90′	—	—	—	—	—?	—?	∓	∓	—

Wenn nun die durch diese Versuche gestützte Annahme sich bewahrheiten sollte, ständen wir vor der jedenfalls eigenartigen Tatsache, daß derselbe Stoff gleichzeitig hämolytisch und antihämolytisch wirkt. Die antihämolytische Wirkung wäre natürlich leicht auf das Fixationsvermögen des Formaldehyds zurückzuführen — wie kommt aber dann die hämolytische Beeinflussung zustande? Ich habe nun daran gedacht, ob es nicht die in jedem käuflichen Formaldehydpräparat spurweise vorhandene Ameisensäure ist, die als hämolytisches Agens fungiert und deren Interferenz mit den fixierenden Funktionen des Formaldehyds die Eigenart der Formalinhämolyse ergeben. In Verfolgung dieser Möglichkeit habe ich das Formalin genau neutralisiert, ohne jedoch eine nennenswerte Abnahme der hämolytischen Eigenschaften zu erzielen. Die im Sinne dieser Hypothese zu fordernde Hemmung der Ameisensäure-Hämolyse durch Formaldehyd erweist sich im Experiment als möglich, wenn auch nur in bescheidenem Maße gegenüber den einfach lösenden Dosen von HCO.OH.

Sodann aber habe ich versucht, aus anderen hämolytisch wirkenden und hemmenden Körpern ein derartiges Gemisch zu konstruieren, in dem aufgeschwemmt die Erythrocyten intakt blieben, bei Verdünnung mit isotonischer NaCl-Lösung aber in

Lösung gehen würden. Versuche mit Osmiumtetroxyd (4 bis 0,2 °/₀₀) sowie mit Sublimat (8 bis 0,8 °/₀₀) und Ameisensäure (2,5 bis 0,25 °/₀₀) gaben negative Resultate, dagegen erzielte ich derartige Gemische bei Kombination von höher konzentrierten Neutralsalzlösungen (NaCl, $MgSO_4$) mit Ameisensäure. Folgende Tabelle gibt eine Reihe derartiger Kombinationen und die Resultate der Verdünnung der damit hergestellten Blutaufschwemmungen.

Tabelle VI.

Gemisch enthält					Davon nach 5 Min. 0,2 ccm + isot. NaCl-Lösung in ccm				
ges. NaCl-Lösg.	ges. $MgSO_4$-Lösg.	isot. NaCl-Lösg.	Ameisensäure 0,25 %	Hammelblut-Aufschw. 13,2 %	0	0,2	0,4	0,6	0,8
0,4	0	0	0,1	0,5	—	—?	∓	#	+
0,2	0	0,2	0,1	0,5	—?	∓	±	+	+
0,1	0	0,3	0,1	0,5	∓	±	+	+	+
0	0,4	0	0,1	0,5	—	—?	∓	♂	+
0	0,2	0,2	0,1	0,5	—?	$\overset{=}{+}$	±	#	+
0	0,1	0,3	0,1	0,5	—?	$\overset{=}{+}$	±	#	+

Eine weitere Ähnlichkeit dieser Gemische mit dem Formaldehyd besteht darin, daß nach einer vorübergehenden (kurzen) Periode erhöhter osmotischer Empfindlichkeit die darin suspendierten Erythrocyten fixiert werden ähnlich wie unter dem Einfluß des Formaldehyds.

Alles in allem ist es momentan schwer zu entscheiden, worauf in der Formaldehydwirkung der hemmende sowohl als der hämolytische Fall zurückzuführen ist — weitere Versuche in den oben angedeuteten Richtungen werden vielleicht die Entscheidung bringen.

Einige weitere orientierende Versuche sollten darüber Aufklärung verschaffen, ob bei der Einwirkung auf Erythrocyten die hämolytische Wirksamkeit des Formalins schwindet resp. aufgebraucht wird. Es wurden verschieden konzentrierte Formaldehydlösungen mit einer gewissen Erythrocytenmenge versetzt und nach entsprechender Zeit weitere solche Mengen resp. deren Multipla zugesetzt; nach einer gewissen Zeit wurde dann mit diesen Gemischen der übliche Verdünnungsversuch ange-

stellt, um zu prüfen, ob auch die frisch zugeführten Blutkörperchen beeinflußt wurden.

Hier der Versuch:

Tabelle VII.

Je 0,1 ccm 50%ige Hammelblutaufschwemmung wird mit 0,08, resp. 0,04, resp. 0,02 Formaldehyd (d. h. entsprechenden Mengen Formalin) versetzt und mit isotonischer NaCl-Lösung in Reihe A auf 0,9 ccm, in Reihe B auf 0,8 ccm, in Reihe C auf 0,6 ccm aufgefüllt. Nach 5 Minuten langem Aufenthalt der Proben bei Zimmertemperatur wird in Reihe A 0,1 ccm, in Reihe B 0,2 ccm, in Reihe C 0,4 ccm der 50%igen Blutaufschwemmung zugesetzt und nach weiteren 10 Minuten der Verdünnungsversuch gemacht, indem aus jedem Röhrchen je 0,2 ccm mit 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ccm isotonischer NaCl-Lösung versetzt werden. Die Resultate dieser Proben sind nach 20stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur verzeichnet.

Formaldehydgehalt %	A					B					C				
	0,2 ccm des endgültigen Gemisches versetzt mit ccm NaCl-Lösung														
	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0,2	0,4	0,6	0,8
8	∓	+	+	+	+	∓	+	+	+	+	koaguliert		+	+	+
4	−?	#	+?	+	+	−?	#	+?	+	+	−?	#	+?	+	+
2	−	±	↗	↗	#	−?	±	↗	↗	#	−?	±	↗	↗	#

Es ergibt sich aus dem Versuch, daß der erste Zusatz von Erythrocyten auch schwächere Formaldehydlösungen durchaus nicht erschöpft, da sie auch 4fache Multipla des ersten Zusatzes noch nachträglich zu lösen imstande sind. Ein anderer Versuch bezweckte die Entscheidung der Frage, ob bei der Lösung der Erythrocyten das ev. gebundene Formaldehyd in Freiheit gesetzt wird. Um den Überschuß des ungebundenen Formaldehyds zu entfernen, wurde eine damit versetzte Erythrocytenaufschwemmung nach 10 Minuten langem Kontakt zentrifugiert, der Bodensatz in der entsprechenden Menge isotonischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt, wobei die Erythrocyten in Lösung gingen. Zu dieser Lösung wurden nun weitere Erythrocyten zugesetzt und nach 10 Minuten langem Kontakt der übliche Verdünnungsversuch angestellt.

Der Versuch ergab, daß die nachträglich zugesetzten Blutkörperchen ungelöst bleiben, es scheinen also nennenswerte Formaldehydmengen nicht frei zu werden. Zur exakteren Be-

antwortung der hier berührten Fragen wären genaue quantitative Untersuchungen nötig, wie sie **Herzog** und **Betzel** unter Verwendung von Hefe angestellt haben und wie ich sie demnächst mit Blutkörperchen zu unternehmen gedenke.

Nicht minder interessante und zum Teil auch schwer deutbare Resultate ergab das Zusammenwirken des Formaldehyds mit anderen hämolytischen Giften. Den Anlaß zu diesen Untersuchungen gab eine große Reihe anderer Versuche, in denen verschiedene chemisch definierte Blutgifte miteinander kombiniert wurden und über deren bemerkenswerte Resultate demnächst berichtet werden soll.

Tabelle VIII illustriert das Zusammenwirken verschiedener Formaldehydkonzentrationen mit hämolytisch wirksamen Konzentrationen von Äthylalkohol resp. Phenol. Sie zeigt, daß die hämolytische Wirkung dieser Stoffe durch den Formaldehyd nicht gehemmt wird, daß aber die koagulierende Wirkung, die sowohl dem Formaldehyd, als auch den beiden anderen Stoffen in höheren Konzentrationen eigen ist, eine Steigerung erfährt, indem die Kombination nicht fällender Konzentrationen fällende Gemische ergibt (unterstrichene Resultate).

Tabelle VIII.

Jedes Röhrchen enthält in 1 ccm Gesamtvolumen 0,1 ccm 13,2%ige Hammelblutaufschwemmung, sowie folgende Zusätze je zweier kombinierter Stoffe.

Die Resultate sind nach 13stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur erhoben. k bedeutet koaguliert, N bedeutet Niederschlag.

Formaldehyd %	Alkohol			Phenol				Ohne Zusatz
	16%	24%	40%	2,56%	1,38%	0,64%	0,32%	
8	k	k	k	k	k	N	N	N
4	k	k	k	N	N	N	N	N
2	$\underline{k}$	$\underline{k}$	k	N	N	$\underline{N}$	$\underline{N}$	—?
1	+	$\underline{k}$	k	N	N	$\underline{N}$	+	–
0	+	+	N	N	N	+	+	–

Es läßt sich aber noch außerdem zeigen, daß Formaldehyd die hämolytische Wirksamkeit des Alkohols sowie des Phenols steigert; an sich unwirksame oder höchstens spurweise hämolysierende Konzentrationen dieser Stoffe (10% beim Äthyl-

akohol, 0,16 % beim Phenol) erreichen im Beisein selbst schwacher Formaldehydkonzentrationen vollständige Hämolyse. Diese Hämolyse tritt ziemlich spät ein, ebenso wie diejenige, die von den eben noch lösenden Konzentrationen beider Stoffe (16 % beim Äthylalkohol, 0,32 % beim Phenol) herbeigeführt wird (s. Tab. IX und XI).

Tabelle IX.

Jedes Röhrchen enthält in 1 ccm Gesamtvolumen 0,1 ccm 13,2 %ige Hammelblutaufschwemmung, sowie folgende Formaldehydkonzentrationen mit oder ohne andere Zusätze. Die Resultate sind nach 30 Minuten, 1 1/2, 3 1/2, 20 Stunden verzeichnet.

außerdem	nach	Formaldehyd in %									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0
isot. NaCl-Lösg.	30′	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	1 1/2 h	N	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	3 1/2 h	·	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 h	·	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10 % $C_2H_5.OH$	30′	+	#	–	–	–	–	–	–	–	–
	1 1/2 h	k	+	–?	–	–	–	–	–	–	–
	3 1/2 h	·	N	±	–	–	–	–	–	–	–
	20 h	·	·	±	±	+	+	+	+	∓	–
KOH n/100	30′	+	+?	–	–	–	–	–	–	–	–
	1 1/2 h	·	+	+?	–	–	–	–	–	–	+
	3 1/2 h	·	·	+	+?	–?	–	–	–	–	·
	20 h	·	·	·	+	↗	±	∓	⩱	∓	·
KOH n/500	30′	+?	–?	–	–	–	–	–	–	–	–
	1 1/2 h	+?	∓	–	–	–	–	–	–	–	–
	3 1/2 h	+?	±	⩱	–	–	–	–	–	–	–
	20 h	+?	↗	∓	⩱	⩱	⩱	∓	±	#	#

Dasselbe Resultat ergab sich, wenn erst, nachdem der Formaldehyd die Erythrocyten beeinflußt hatte, im Verdünnungsversuche 10 % Alkohol auf sie einwirkten (s. Tabelle X).

Ähnlich wie Äthylalkohol verhält sich Methylalkohol (s. Tabelle XI), ganz anders dagegen Aceton, dessen hämolytische Eigenschaften sonst denen des Äthylalkohols sehr nahestehen. Dieses hemmt die hämolytische Wirkung stärkerer Formaldehydkonzentrationen, fördert diejenige der schwachen Konzentrationen (s. Tabelle X, XII) — umgekehrt wird die hämolytische Wirkung des Acetons auch von schwachen Formaldehydkonzentrationen stark gehemmt (s. Tabelle XI).

Tabelle X.

Je 0,2 ccm 50%iger Hammelblutaufschwemmung wurden in je 1 ccm Gesamtvolumen mit verschiedenen Formaldehydkonzentrationen versetzt. Nach 15 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur wurde der Verdünnungsversuch angestellt, indem je 0,2 ccm der Gemische mit 0, 0,2, 0,4, 0,8 ccm isotonischer NaCl-Lösung, sodann aber mit 0,2 ccm 20%igem, mit 0,4 ccm 15%igem, mit 0,8 ccm 12,5%igem Alkohol (resp. Aceton) versetzt wurden (so daß in der Probe überall eine 10%ige Alkohol- resp. Acetonlösung resultierte). Die Resultate sind nach 20stündigem Verweilen der Proben bei Zimmertemperatur verzeichnet.

Formaldehydgehalt	Je 0,2 ccm des Gemisches versetzt mit								
	·	0	0,2	0,4	0,8	·	0,2	0,4	0,8
0,5%	Isotonische NaCl-Lösung	—	—	—	—	Alkohol	+	+	+
0,25%		—	—	—	—		+	+	+
0,125%		—	—	—	—		+	+	+
0,062%		—	—	—	—		+	+	+?
—		·	·	·	—		—?	—?	—?
8%	Isotonische NaCl-Lösung	—? k	—? N	—? N	—? N	Aceton	—? k	—? k	—? k
4%		—	+?	+	+		#	+?	+
2%		—	#	+?	+		$\overline{\mp}$	↗	↗
1%		—	—?	$\overline{\mp}$	$\overline{\mp}$		—	—?	#
0		·	·	·	·		—	—	—?

· bedeutet, daß die betreffende Probe nicht gemacht wurde.

Tabelle XI.

Je 0,1 ccm 13,2%ige Hammelblutaufschwemmung wurde mit den untengenannten Formaldehyd- und anderen Zusätzen in 1 ccm Gesamtvolumen versetzt und die Resultate nach 30 Minuten sowie 20 Stunden langem Verweilen bei Zimmertemperatur abgelesen.

Zusatz	Formaldehyd in %									
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0
CH_3OH	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
0,2	k	N	+	+	+	+	+	+	+	∓
$C_6H_5.OH$	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
1,6%, 0,1	k	N	∓	∓	+?	+	+	+	#	$\overline{\mp}$
$CaBr_2$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ges. Lösg. 0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Aceton	N	N	N	N	—	—	—	—	—	+
0,2	·	·	·	·	—	—	—	—?	—?	·
Aceton	k	+	—	—	—	—	—	—	—	—
0,1	·	k	—	—	—	—	—	—	—	—?

Tabelle XII.

Je 0,1 ccm 50%iger Hammelblutaufschwemmung wird mit 8, 4, 2, 1% Formaldehyd, sowie 0, 10, 30% Aceton in 1 ccm Gesamtvolumen versetzt. Nach 15 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur werden je 0,2 ccm der Gemische mit 0, 0,2, 0,4, 0,8 ccm isotonischer NaCl-Lösung versetzt und das Resultat dieser Proben nach 20 stündigem Verweilen bei Zimmertemperatur verzeichnet.

Formaldehydgehalt %	0% Aceton				10% Aceton				30% Aceton			
	0	0,2	0,4	0,8	0	0,2	0,4	0,8	0	0,2	0,4	0,8
8	−? / k	⩱	⩱	⩱	k	·	·	·	k	·	·	·
4	−	+?	+	+	⩱	+	+	+	−	−	−?	⩱
2	−	#	+?	+	−?	+	+	+	−	−	⩱	⩱
1	−	−?	⩱	⩱	−?	♐	+?	+	−	⩱	♐	+?

Tabelle XIII.

Je 0,1 ccm 50%iger Hammelblutaufschwemmung wurde mit verschiedenen Formaldehydkonzentrationen sowie mit 0,1 resp. 0,02 gesättigter wässeriger K_3AsO_3-Lösung in 1 ccm Gesamtvolumen versetzt. Nach 2, 5, 15, 15 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur wurden je 0,2 ccm der Gemische mit 0, 0,2, 0,4, 0,8 ccm isotonischer NaCl-Lösung versetzt und das Resultat dieser Proben nach 14 stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur festgestellt.

Formaldehydgehalt %	Nach	0,1 ges. K_3AsO_3-Lösg.				0,02 ges. K_3AsO_3-Lösg.			
		0	0,2	0,4	0,8	0	0,2	0,4	0,8
8	2′	∓	+	+	+	+	+	+	+
4	5′	⩱	−?	−?	−	∓	+	+	+
2	15′	−?	−?	−	−	⩱	±	−?	−
1	15′	−?	−	−	−	−?	−	−	−

Die Saponinhämolyse wird durch Formaldehydzusatz beschleunigt und verstärkt, ebenso diejenige durch Chloralhydrat ($^1/_{100}$ bis $^1/_{400}$ gesättigt), die Hämolyse durch 5‰ Natriumglykocholat etwas verzögert, diejenige durch 1‰ stark beschleunigt. Die Hämolyse durch stark konzentrierte Neutralsalze wird durch Formaldehydlösungen stark gehemmt (s. Tabelle XI), ebenso diejenige durch Kaliumarsenit ($^1/_{10}$ resp. $^2/_{10}$ gesättigt), das seinerseits wieder die Formaldehydhämolyse hemmt (s. Tabelle XIII). Eigenartig ist der Einfluß des Formaldehyds auf die Hämolyse durch das ebenfalls hydrolytisch gespaltene Cyankalium. Mittlere Formaldehydmengen hemmen sehr stark die KCN-Hämolyse, schwache Konzentrationen beschleunigen und verstärken sie. Der zeitliche Faktor macht sich insofern bemerkbar, daß beim Präventivversuch

Tabelle XIV.

Verschiedene Formaldehyd- und KCN-Mengen wurden in Reihe A in 0,9 ccm Gesamtvolumen gemischt und sodann 0,1 ccm 13,2%iger Hammelblutaufschwemmung zugesetzt (Simultanversuch). In Reihe B wurden die entsprechenden Formaldehydmengen mit 0,1 ccm Blutaufschwemmung in 0,9 ccm Gesamtvolumen gemischt und nach 8 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur die entsprechenden KCN-Mengen in 0,1 ccm zugesetzt (Präventivversuch). In Reihe C wurden die entsprechenden KCN-Mengen mit 0,1 ccm Blutaufschwemmung in 0,6 ccm Gesamtvolumen vermischt und nach 8 Minuten langem Kontakt bei Zimmertemperatur die entsprechenden Formaldehydmengen in 0,4 ccm zugesetzt (Heilungsversuch). Die Resultate sind nach 30 Minuten, 1½, 4 und 20 Stunden bei Zimmertemperaturen verzeichnet (Kontrolle ohne KCN s. Tabelle IX).

Reihe	KCN	Nach	Formaldehyd in %									
	%		8	4	2	1	1,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0
A	1	30′	∓	–	–	–	–	+	+	+	+	–
		1½h	∓	–?	–	–	–	·	·	·	·	–
		4h	∓	–?	–	–	–	·	·	·	·	♐
		20h	∓	–?	–?	–?	–?	·	·	·	·	+
	0,2	30′	+	♐	–	–	–	–	–	♐	–?	–
		1½h	·	♐	–	–	–	–	–	+	+	–
		4h	·	♐	–	–	–	–	–	·	·	–
		20h	·	♐	–	–	+	+	+	·	·	∓
B	1	30′	+	–?	–	–	–	+	+	+	–	–
		1½h	·	⩱	–	–	–	·	·	·	+	–
		4h	·	∓	–	–	–	·	·	·	·	∓
		20h	·	∓	–?	–?	–?	·	·	·	·	+
	0,2	30′	+	–?	–	–	–	–	–	–	–	–
		1½h	·	⩱	–	–	–	–	–	+	♐	–
		4h	·	⩱	–	–	–	–	–	·	+	–
		20h	·	⩱	–?	–?	⩱	+	+	·	·	∓
C	1	30′	–	–	–	–	–	#	+	+	#	–
		1½h	–	–	–	–	–	+?	·	·	+	–
		4h	⩱	–	–	–	–	+	·	·	·	♐
		20h	⩱	–?	–?	–	–?	·	·	·	·	+
	0,2	30′	+	–?	–	–	–	–	–	∓	–	–
		1½h	·	♐	–?	–	–	–	–	♐	+	–
		4h	·	♐	∓	⩱	–	–	–	+	·	–
		20h	·	♐	∓	∓	#	+	+	·	·	∓

(wo der Formaldehyd zuerst auf die Erythrocyten einwirkt und dann das KCN) die Hemmung bei 0,2 °/₀ KCN stärker ausfällt, beim Heilungsversuch (wo das H.COH zuerst einwirkt und dann das KCN) die definitive Heilung bei 0,2 °/₀ KCN unmöglich wird (s. Tabelle XIV).

Nicht minder interessant ist der Einfluß des Formaldehyds auf die Harnstoffhämolyse und umgekehrt des Harnstoffs auf die Formaldehydhämolyse. Durch Formaldehyd wird die hämolytische Grenzkonzentration des Harnstoffs auf $^1/_8$ (von $^8/_{10}$ gesättigt auf $^1/_{10}$) herabgedrückt; rückt man bis an die gewöhnliche Grenzkonzentration heran, so erfolgt die Harnstoffhämolyse, die sonst nur sehr langsam vor sich geht, fast momentan (s. Tabelle XV).

Tabelle XV.

Verschiedene Formaldehyd- und Harnstoffmengen werden in einem Gesamtvolumen von 1 ccm mit je 0,1 ccm 13,2 °/₀iger Hammelblutaufschwemmung versetzt und die Resultate nach 2 sowie nach 15stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur aufgenommen.

Gesättigte Harnstofflösung	nach	Formaldehydgehalt in °/₀									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0
0,1 ($^1/_{10}$)	2^h	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	15^h	k	k	N	+	+	—	—	—	—	—
0,2 ($^2/_{10}$)	2^h	k	k	+	+	+	—?	—	—	—	—
	15^h	.	.	.	.	.	$\overline{\mp}$	—?	—	—	—
0,4 ($^4/_{10}$)	2^h	k	k	+	+	+	+	+	$\mp$	$\overline{\mp}$	—?
	15^h	.	.	.	.	.	.	.	+	#	↗

Komplizierter ist der Einfluß des Harnstoffs auf die Formaldehydhämolyse. Wie aus Tabelle XVI ersichtlich ist, ist bei höheren Formaldehydkonzentrationen (8 bis 4 bis 2 °/₀) eine ausgesprochene Hemmung festzustellen, bei niedrigeren (1 bis 0,031 °/₀) eine ebenso markante Verstärkung. Bei 2 °/₀igem Formaldehyd tritt bei schwacher Verdünnung oder ohne Verdünnung (0 bis 0,2) die Harnstoffhämolyse ein, bei stärkerer Verdünnung die Hemmung der Formaldehydhämolyse (0,4 bis 0,8). Die Hemmung der Formaldehydhämolyse durch Harnstoff ($^1/_{10}$ ges.) erweist sich auch im Heilungsversuch als möglich, d. h. auch, nachdem der Formaldehyd allein eine Zeitlang auf die Blutkörperchen eingewirkt hat.

Die KOH-Hämolyse wird durch Formaldehyd gehemmt und diese Hemmung zeigt die Eigentümlichkeit, daß zur Hemmung stärkerer KOH-Konzentrationen schwächere Formaldehydkonzentrationen sich eignen, und umgekehrt. Stärkere KOH-

Tabelle XVI.

Je 0,1 ccm 50%iger Hammelblutaufschwemmung wird mit verschiedenen Formaldehydmengen in Reihe A unter Zusatz von 0,1 ccm gesättigter Harnstofflösung, in Reihe B ohne solchen in 1 ccm Gesamtvolumen versetzt. Nach 2, 5, 15, 30, 60 Minuten werden je 0,2 ccm der verschiedenen Gemische mit 0, 0,2, 0,4, 0,8 ccm isotonischer NaCl-Lösung versetzt und die Resultate nach 15stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur verzeichnet.

Formaldehydgehalt %	nach	Reihe A				Reihe B			
		0	0,2	0,4	0,8	0	0,2	0,4	0,8
8	2′	−?	−?	−	−	$\overline{\mp}$	+	+	+
4	5′	∓	$\overline{\mp}$	−?	−	−	∓	+?	+
2	15′	+	+?	∓	$\overline{\mp}$	−	∓	♐	+?
1	30′	+	+	+	+?	−	−	−?	−?
0,5	60′	∓	+?	+	+	−	−	−	−
0,25	60′	$\overline{\mp}$	♐	#	♐	−	−	−	−
0,125	60′	$\overline{\mp}$	∓	∓	∓	−	−	−	−
0,062	60′	$\overline{\mp}$	∓	∓	∓	−	−	−	−
0,031	60′	$\overline{\mp}$	∓	∓	$\overline{\mp}$	−	−	−	−

Tabelle XVII.

Je 0,1 ccm 13,2%iger Hammelblutaufschwemmung wird mit verschiedenen Formaldehyd- sowie NH_3-Mengen in 1 ccm Gesamtvolumen versetzt und die Resultate nach 30 Minuten, $3^1/_2$ sowie 17 Stunden langem Aufenthalt bei Zimmertemperatur verzeichnet.

NH_3	nach	Formaldehydgehalt in %									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0
0	30′	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	$3^1/_2$h	N	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	17h	·	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2,5%	30′	+	♐	+	+	+	+	+	+	+	+
	$3^1/_2$h	·	+	·	·	·	·	·	·	·	·
	17h	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
0,25%	30′	#	−	−	−	−?	♐	#	+?	+?	∓
	$3^1/_2$h	+	−	−	−	+	+	+	+	+	#
	17h	·	−?	−	∓	·	·	·	·	·	+
0,25‰	30′	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	$3^1/_2$h	−	−	−	−	−	−	−	∓	∓	$\overline{\mp}$
	17h	$\overline{\mp}$	−	−	−	−	−?	♐	+	+	$\overline{\mp}$

Konzentrationen scheinen die Formaldehydhämolyse zu fördern (s. Tabelle IX).

Auf die Ammoniakhämolyse übt der Formaldehyd je nach der Konzentration einen verschiedenen Einfluß aus: stärkere Konzentrationen hemmen, schwache beschleunigen und verstärken sie (Tabelle XVII).

Die Formaldehydhämolyse wird vom Ammoniak gehemmt, und zwar am besten von den schwächsten Konzentrationen (8 % Formaldehyd, 0,25 ‰ NH_3).

Die Kaliumpermanganathämolyse wird von stärkeren Formaldehydkonzentrationen stark gehemmt, von schwächeren beschleunigt und verstärkt (s. Tabelle XVIII).

Tabelle XVIII.

Je 0,1 ccm 13,2 %iger Hammelblutaufschwemmung wird mit verschiedenen Formaldehyd- und $KMnO_4$-Mengen in 2 ccm Gesamtvolumen versetzt und die Resultate nach 1, 2, 7 und 22stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur verzeichnet (Kontrolle ohne $KMnO_4$ s. Tabelle IX).

$KMnO_4$	nach	Formaldehydgehalt in %									
		8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0
16/200 000	1^h	N	–	–	–	+?	+	+	+	+	+
	2^h	.	–	–	–	+	.	.	.	.	.
	7^h	.	–	–	–	.	.	.	.	.	.
	22^h	.	–	–	–	.	.	.	.	.	.
1/200 000	1^h	+	$\mp$	–	–	–	–?	#	+	+	$\overset{=}{+}$
	2^h	.	+?	–	–	–	$\overset{=}{+}$	+	.	.	$\mp$
	7^h	.	+?	–	–	–	+	.	.	.	#
	22^h	.	–	–	–	$\overset{=}{+}$	.	.	.	.	+

Auffallend ist, daß, entgegen der wohl naheliegenden Erwartung, die Formaldehydhämolyse von Serum weder im Simultan- noch auch im Präventivversuch gehemmt wird; es scheint die Affinität der Erythrocytensubstanz für das Formaldehyd dazu zu groß zu sein, wofür ja auch die früher mitgeteilten Versuche sprechen, die zeigen, daß bei der Formaldehydhämolyse der Formaldehyd nicht wieder freigemacht wird.

Was für ein Mechanismus die soeben mitgeteilten, zum Teil komplizierten Erscheinungen des Zusammenwirkens des Formaldehyds mit anderen Hämolyticis beherrscht, läßt sich zurzeit wohl kaum entscheiden, um so mehr als ja auch der

Mechanismus der Formaldehydhämolyse an sich noch nicht ganz geklärt ist. Ein orientierender Versuch spricht dafür, daß im Falle der Verstärkung der Hämolyse ein direkter Kontakt des Formaldehyds mit dem anderen Hämolyticum nicht nötig erscheint. Es wurden Erythrocyten mit schwachen, an sich unwirksamen Formaldehydkonzentrationen (1 % bis 0,062 %) versetzt, nach einstündigem Kontakt abzentrifugiert und in an sich unwirksamen Lösungen von Äthylalkohol, KOH, NH_3, Na_2CO_3, KCN aufgeschwemmt. Hämolyse trat überall trotz Abwesenheit von freiem Formaldehyd ein.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Formaldehydlösungen von 8 % aufwärts lösen und fällen sodann verschiedene Blutkörperchenarten, 4 %ige und schwächere lassen sie scheinbar unverändert, um sie nach einer je nach der Formaldehydkonzentration wechselnden Zeit zu fixieren.

2. Innerhalb dieses Zeitraumes bis zur Fixierung sind mit 4 bis 1 %igen Lösungen behandelte Erythrocyten osmotisch überempfindlich, und, während sie, sich selbst überlassen, intakt bleiben, werden sie bei 2 bis 5facher Verdünnung der Aufschwemmung mit isotonischer NaCl-Lösung gelöst.

3. Dieser ganz eigenartige Mechanismus der Hämolyse ist durch eine Hemmung bedingt, die durch Verdünnung des Gemisches aufgehoben wird. Der hemmende Stoff ist entweder der von den Erythrocyten nicht gebundene Formaldehyd selbst oder irgendein Umwandlungsprodukt, das bei seiner Einwirkung auf Erythrocyten entsteht.

4. Formaldehyd hemmt die Hämolyse der von ihm selbst beeinflußten Erythrocyten, und zwar genügen dazu zweimal schwächere Konzentrationen als diejenigen, in denen die betreffenden Erythrocyten vorbehandelt wurden.

5. Mit Formaldehyd vorbehandelte und vom Überschuß durch Abzentrifugieren befreite Blutkörperchen werden gelöst, wenn man sie in isotonischer NaCl-Lösung aufschwemmt.

6. Durch Kombination von gesättigten Neutralsalzlösungen und Ameisensäure gelingt es, Gemische von ähnlicher Wirkung wie das Formalin herzustellen.

7. Die Beeinflussung der Erythrocyten durch den Formaldehyd wird durch höhere Neutralsalzkonzentrationen sehr

verstärkt, die Hämolyse der formalinisierten Erythrocyten gehemmt.

8. Bei der Formaldehydhämolyse wird aus den gelösten Erythrocyten der Formaldehyd nicht wieder frei.

9. Die hämolytische Wirkung von Alkohol, Phenol, Saponin, Chloralhydrat, Natriumglykocholat wird durch Formaldehyd gesteigert, ebenso die koagulierende Wirkung von Phenolalkohol und Aceton.

10. Aceton hemmt die hämolytische Wirkung stärkerer Formaldehydkonzentrationen, fördert diejenige schwacher; die Acetonhämolyse wird vom Formaldehyd stark gehemmt.

11. Die KCN-, $KMnO_4$- sowie NH_3-Hämolyse wird durch höhere Formaldehydkonzentrationen gehemmt, durch schwächere verstärkt und beschleunigt.

12. Die KOH-, $CaBr_2$- und K_3AsO_3-Hämolyse wird vom Formaldehyd gehemmt.

13. Die Harnstoffhämolyse wird durch Formaldehyd verstärkt; die Hämolyse durch stärkere Formaldehydkonzentrationen wird durch Harnstoff gehemmt, diejenige durch schwache gesteigert.

14. Serum hemmt die Formaldehydhämolyse nicht.

Zur Chemie der Blutgiftanämien.

Von

R. Maidorn.

(Aus der Kgl. med. Universitäts-Poliklinik in Halle a. S.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Ansicht, daß die Blutveränderungen bei der perniziösen Anämie des Menschen durch einen im Körper selbst entstandenen Giftstoff hervorgerufen seien, hat sich in den letzten Jahren immer mehr befestigt. Als Stütze für diese Lehre können sowohl klinische als auch experimentelle Erfahrungen herangezogen werden. Bei einer Anzahl klinischer Formen der perniziösen Anämie ist eine Giftwirkung zweifellos vorhanden, z. B. bei der Bandwurmanämie, der schweren Anämie bei Syphilis. Ebenso deuten die Magen- und Darmveränderungen bei der perniziösen Anämie auf ein vom Magendarmkanal aus wirkendes Gift hin. Bei der Bothriocephalusanämie glauben Faust und Tallquist[1]) das toxische Prinzip gefunden zu haben. Es ist ihnen gelungen, aus der Leibessubstanz des breiten Bandwurmes in der Cholesterin-Ölsäureesterverbindung eine Substanz zu isolieren, die sehr starke hämolytische Eigenschaften entfaltet. Die Autoren nehmen an, daß beim Absterben des Wurmes im Darm dieser Stoff in die Blutbahn übergeht und dort die roten Blutkörperchen auflöst. Interessant ist, daß in der Tat die Ölsäure, an Gesunde verfüttert, be-

[1]) Faust und Tallquist, Über die Ursachen der Botriocephalusanämie. Arch. f. experim. Pathol. u. Therap. **57**, 367, 1907.

trächtliche Anämie hervorrufen kann. Aus der Magen- und Darmschleimhaut bei Gesunden und in angeblich wirksamerer Menge bei Perniziös-Anämischen haben Berger und Tsuchyia[1]) ebenfalls hämolysierende Lipoidstoffe dargestellt.

Bekanntlich sind die ersten von Biermer beschriebenen Fälle von perniziöser Anämie im Wochenbett beobachtet worden. Der Gedanke, daß hierbei das vermittelnde Agens in Schwangerschaftsvorgängen zu suchen sei, wurde besonders nahe gelegt, als man die Hämoglobinurie in der Schwangerschaft und andere auf Giftwirkungen des Uterusinhaltes hindeutende Störungen — Eklampsie — besser kennen lernte. Freund und Mohr[2]) haben mit Rücksicht auf die Anämie und die Hämoglobinurie der Schwangeren die Placenta auf hämolytische Stoffe untersucht und festgestellt, daß in der Placenta ein Blutkörpergift enthalten ist, das jedenfalls zum Teil ebenfalls aus Ölsäure besteht. Auf das Vorkommen hämolytischer Stoffe in den Körperorganen im allgemeinen haben vor längerer Zeit schon Metschnikoff und Levaditi hingewiesen. Von Morgenroth und Korschun[3]) u. a., besonders in letzter Zeit von Friedemann[4]), sind diese hämotoxischen Stoffe der Organe studiert worden. Wir wissen jetzt, daß es sich hierbei um Lipoidsubstanzen handelt, die in Alkohol, zum Teil auch in Äther löslich sind und sehr beträchtliche hämolytische Eigenschaften haben. Sie unterscheiden sich von den Serumhämolysinen Ehrlichs dadurch, daß sie nicht komplexer Art und hitzebeständig sind. Sie werden in normalen Organen nur in geringer Menge und durchaus nicht in allen gefunden. In sehr beträchtlicher Menge treten sie in den der Autolyse unterworfenen Organen auf, ebenso in verfetteten Organen. Die chemische Natur dieser Substanzen ist nicht völlig geklärt. Sicher ist dabei nicht nur die Ölsäure der wirksame Blutkörperchen

---

[1]) Berger und Tsuchyia, Deutsches Arch. f. klin. Med. 96, 252, 1911.

[2]) Mohr und Freund, Zur Pathogenese der Eklampsie. Berl. klin. Wochenschr. 26, 1908.

[3]) Korschun und Morgenroth, Über die hämolytischen Eigenschaften von Organextrakten. Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 37.

[4]) Friedemann, Über die hämotoxischen Stoffe der Organe. Arch. f. Hygiene 69.

lösende Stoff, wie auch aus den folgenden Untersuchungen hervorgeht. Ein besonderes Interesse gewinnen diese in verfetteten Organen vorkommenden Substanzen dadurch, daß in den klinischen Fällen von perniziöser Anämie die Organverfettung der charakteristische autoptische Befund ist, und daß die Mehrzahl, wenn nicht alle sogenannten Blutgifte, die im Experiment ein der perniziösen Anämie des Menschen sehr ähnliches Symptomenbild hervorbringen mit den stärksten Organverfettungen einhergeht. Mohr[1]) hat vor einigen Jahren auf diese Tatsachen hingewiesen und die Ansicht vertreten, daß bei der perniziösen Anämie des Menschen die Organverfettung nicht, wie man bisher annahm, die Folge der Blutveränderung, sondern ihre Ursache, zum mindesten etwas Koordiniertes sei. Er hat dabei betont, daß bei der Organverfettung zwei Prozesse nebeneinander hergehen, die durchaus verschiedene biologische Bedeutung haben. Zunächst handelt es sich um die Fettmetamorphose, die infolge der Dekomposition der Organzellen durch das einwirkende lipoidlösliche Gift entsteht, und weiterhin um den Vorgang der Fettinfiltration, als Ausdruck des infolge der allgemeinen Ernährungsstörung einsetzenden Fettransportes. Nur die bei der Fettmetamorphose entstehenden Lipoidsubstanzen sind für die Hämolyse von Bedeutung. Man kann sich vorstellen, daß das primäre Gift zuerst zu einer Verfettung der Organe und dadurch zur Bildung hämotoxischer Stoffe führt, die, in die Blutbahn gebracht, die Erythrocyten zerstören. Gerade einige Formen perniziöser Anämie ordnen sich diesem Gedankengange sehr gut unter. Bei der schweren Anämie der Syphilitiker finden sich, wie die Wassermannsche Reaktion, die zum Teil wenigstens eine Reaktion auf Lipoide ist, anzeigt, lipoide Stoffe in einer von der Norm abweichenden Form im Blut. Wenn in der größten Mehrzahl von Lues trotzdem die Anämie nicht beobachtet wird, so braucht das nicht gegen diese Hypothese zu sprechen. Wir müssen in Betracht ziehen, daß eine genügende Menge von Schutzstoffen die Hämolyse paralysieren kann. Als solche

[1]) Mohr, Zur Biologie und Chemie der Organverfettung. Verh. d. Gesellsch. deutsch. Naturf. u. Ärzte **1910**, Abt. f. inn. Med. Oppenheimers Handb. d. Biochem. **4**. Abschnitt: Stoffwechsel bei Anämien usw.

kommen, wie Noguchi, von Liebermann, Mohr und Freund und neuerdings Joannovics und Pick gefunden haben, die Eiweißkörper des Serums, das Cholesterin und die Neutralfette in Betracht. Besonders wirksame Hämolysine sind aus Carcinomgewebe isoliert worden (Kullmann). Es wäre durchaus denkbar, daß die schweren Blutveränderungen bei dieser Erkrankung auf den Übergang von Hämolysinen aus der Geschwulst zu beziehen sind. An Bedeutung gewinnt aber die Mohrsche Hypothese, wenn man den Mechanismus der Wirkung einiger Blutgifte, und zwar eines der typischsten des Toluylendiamins, betrachtet. Während die Vergiftung mit dieser Substanz im Tierkörper die schwersten Veränderungen der Erythrocyten hervorruft, findet in vitro eine Auflösung der roten Blutzellen durch das Gift gar nicht oder nur in geringem Maße statt (Kobert[1]) u. a.). Dagegen macht es, wie alle Blutgifte, eine schwere Degeneration der Leber. Der Gedanke liegt nahe, daß nur durch die Vermittlung der Leberschädigung die Blutveränderungen auftreten. Vor kurzen haben nun Joannovics und Pick[2]) gezeigt, daß bei dieser Leberveränderung ein Hämolysin auftritt, und daß nur auf dem Wege über dieses das Toluylendiamin die Auflösung der Erythrocyten zustande bringt. Die Autoren haben dabei noch weitere wichtige Befunde erhoben: Zwischen der akuten und chronischen Vergiftung bestehen hinsichtlich des Hämolysins und der Beeinflussung seiner Wirksamkeit durch die Anwesenheit der Milz im Körper bedeutende Differenzen. Bei der chronischen Vergiftung fanden sie ein durch die Milzexstirpation beeinflußbares Hämolysin, das nach der Ansicht von Joannovics und Pick mit den hämolytischen Substanzen identisch sein dürfte, die bei fettiger Organmetamorphose bzw. bei der Organautolyse entstehen und im wesentlichen niederen und höheren Fettsäuren zuzurechnen sind. Das bei der akuten Vergiftung auftretende Hämolysin ist im Gegensatz hierzu durch die Milzexstirpation nicht zu beeinflussen. Bezüglich der Natur der hämolytischen Stoffe haben Joannovics und Pick festgestellt, daß das bei der akuten Vergiftung in der Leber auftretende

[1]) Kobert, Lehrbuch der Toxikologie, S. 785.

[2]) Joannovics und Pick, Beitrag zur Kenntnis der Toluylendiaminvergiftung. Zeitschr. f. experim. Pathol. und Therap. 6, 185 ff.

Hämolysin in Methyl- und Äthylalkohol, in Äther und Aceton löslich sowie hitzebeständig ist, ferner daß in der chronisch verfetteten Leber Palmitin-, Stearin- und Ölsäure nachweisbar sind und daß in der autolysierten Leber freie Fettsäuren mit hämolytischer Wirksamkeit auftreten, die aus den nicht hämolysierenden Lipoiden entstehen.

Man kann zunächst die Frage aufwerfen, ob die Befunde bei der Vergiftung mit Toluylendiamin auch für andere ähnliche Veränderungen an den Organen hervorrufende Stoffe gelten. Trotz vieler äußerer Ähnlichkeiten bestehen zwischen den Giften bedeutende Unterschiede. Es sei hier z. B. auf die Gewöhnung von Hunden an die lange dauernde Verabreichung von Toluylendiamin hingewiesen, wie dies auch vom Phosphor bekannt ist, dagegen nicht beim Nitrobenzol. Die groben Organveränderungen sind bei den beiden Giften ziemlich ähnlich. Ich habe mir deshalb im folgenden zur Aufgabe gemacht, die Toluylendiaminvergiftung mit der P-Vergiftung zu vergleichen. Auch Joannovics und Pick erwähnen, daß sie solche Versuche unternommen hätten, teilen aber keine Resultate mit.

Die Methodik, nach der ich arbeitete, ist die von Joannovics und Pick beschriebene. Der Hund wird durch Entbluten getötet, die Leber lebenswarm entnommen, in der Fleischmaschine faschiert und mit der 3fachen Menge 95%igen Alkohols auf dem Wasserbade mit Rückflußkühler gekocht, dann wird filtriert, der Rückstand im Faustschen Apparate getrocknet. Er wird 48 Stunden mit Äther extrahiert, vom Alkoholextrakt der Alkohol abgedampft, der Rückstand mit Äther aufgenommen und mit dem Soxhletäther vereinigt. Aus diesem Ätherextrakt werden eine Reihe störender Substanzen mit Aceton gefällt, man läßt absetzen und filtriert dann. Das Filtrat wird zur Trockne eingedampft, der Rückstand wird gewogen und mit Methylalkohol so lange auf dem Wasserbade digeriert, bis die Flüssigkeit klar bleibt. Bei meinen Versuchen bin ich nun so verfahren, daß jedesmal 100 g Leberbrei genommen wurden und der Methylalkoholextrakt auf 100 ccm aufgefüllt wurde; 10 ccm davon wurden mit Methylalkohol auf das 10fache verdünnt und diese Verdünnung zu den hämolytischen Versuchen verwendet. Auf diese Weise werden gleiche Gewichtsmengen (100 g) des verarbeiteten Organes hinsichtlich ihres hämolytischen Wertes miteinander verglichen. Die Verdünnung mit Methylalkohol muß man möglichst groß nehmen, um die vom Methylalkohol hervorgerufene Eiweißfällung, die die Beurteilung der Hämolyse sehr stören kann, auszuschalten. Das hämolytische System war folgendermaßen angeordnet:

Nr.	Methylalkohol-extrakt	NaCl 0,85 %	5 %ige Hammel-blutkörperchen-aufschwemmung
1	1,0	—	je 0,2 ccm
2	0,8	0,2	
3	0,6	0,4	
4	0,4	0,6	
5	0,2	0,8	
6	0,1	0,9	
7	0,08	0,92	
8	0,06	0,94	
9	0,04	0,96	
10	0,02	0,98	
11	—	1,0	

Die Hunde befanden sich bei Beginn der Versuche alle in gutem Ernährungszustande. Bei den Vergiftungen der Hunde mit und ohne Milzexstirpation wurden möglichst gleichschwere Exemplare genommen. Da jedoch ein Teil der Hunde vorzeitig starb, ließ sich diese Absicht nicht völlig durchführen. Die Gewichtsdifferenzen sind jedoch nicht so groß, daß dadurch die Beurteilung der Versuche wesentlich erschwert würde. Außerdem wurde beim Tode eines Tieres das Paralleltier getötet.

Normalleber.

Der 6,3 kg schwere Hund wurde durch Entbluten getötet, von der 250 g schweren Leber wurden sofort 100 g zu Leberbrei verarbeitet, 100 g mit der dreifachen Menge 0,85 %iger steriler NaCl-Lösung 48 Stunden lang im Brutschrank bei 37° stehen gelassen. Der Ätheracetonrückstand der normalen Leber betrug 0,71 g, die Hämolyse war nach 2 Stunden in Röhrchen Nr. 1 bis 3 komplett, nach 4 Stunden Nr. 1 bis 4 komplett, Nr. 5 partiell, Nr. 6 bis 11 Null. Es lassen sich mit dieser Methode also auch schon in der normalen Leber hämolytisch wirkende Substanzen nachweisen.

Autolysierte Leber.

Das Gewicht des Ätheracetonrückstandes von dem obenerwähnten 48 Stunden im Brutschrank verbliebenen Leberbrei betrug 2,22 g. Die Hämolyse war nach 2 Stunden Nr. 1 bis 8 komplett, nach 4 Stunden Nr. 1 bis 9 komplett, Nr. 10 bis 11 Null. Der hämolytische Wert der autolysierten Leber ist also bedeutend höher als der einer normalen Leber. Damit einhergehend ist der Lipoidgehalt auch auf den etwa dreifachen Wert gestiegen.

Es wurden nun Hunde akut und chronisch mit Toluylendiamin vergiftet, einem Teil der Tiere wurde vorher die Milz exstirpiert. Das Tol. wurde in etwas Milch gelöst per os gegeben.

I. Akute Vergiftung mit Toluylendiamin.

Das Gewicht des Hundes betrug 8,1 kg. Vergiftet wurde er mit 1 g Tol. Tod trat nach 12 Stunden ein, es war kein Ikterus vorhanden, die Leber war makroskopisch nicht verfettet, das Gewicht der Leber betrug 260 g; 100 g Brei ergaben 3,15 g Ätheracetonrückstand (dickflüssig). Die Hämolyse ist nach 2 Stunden Nr. 1 bis 5 komplett, Nr. 6 partiell; nach 4 Stunden Nr. 6 komplett, Nr. 7 partiell, Nr. 8 bis 11 Null. Der Ätheracetonrückstand hat also einen hohen Gewichtswert, ebenso die Hämolyse einen hohen Grenzwert.

II. Akute Toluylendiaminvergiftung mit Milzexstirpation.

Das Gewicht des Hundes betrug 8,5 kg, die Milz wurde am 13. III. 1912 exstirpiert, vergiftet am 20. III. 12 mit 1,5 g Tol. Der Hund wurde nach 20 Stunden getötet. Es war kein Ikterus vorhanden, die Leber makroskopisch nicht verfettet. Das Gewicht der Leber betrug 490 g; 100 g Brei ergaben 3,79 g Ätheracetonrückstand (dickflüssig). Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 4 komplett, 5 partiell; nach 4 Stunden 1 bis 5 komplett, 6 partiell; nach 4 Stunden 1 bis 5 komplett, 6 partiell, 7 Spuren. Bemerkenswert ist die höhere Giftdosis für den milzexstirpierten Hund, auf die auch schon Joannovics und Pick hingewiesen haben.

III. Chronische Toluylendiaminvergiftung mit Milz.

Der 10,7 kg schwere Hund wurde mit 2,75 g Tol. in toto vergiftet, und zwar erhielt er am 10., 12., 16. I. 1912 je 0,20 g, am 24., 30., 31. I., am 6. II. je 0,25 g, am 7., 8., 9. II. je 0,3 g per os. Das Tier starb am 10. II., bereits am 24. I. war Ikterus aufgetreten, der immer stärker wurde, die Leber war stark verfettet, es bestand starke Anämie. Das Gewicht der Leber betrug 142 g; 100 g Brei ergaben 1,51 g Ätheracetonrückstand. Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 4 komplett, 5 partiell; nach 4 Stunden 1 bis 5 komplett, 6 Spuren, 7 bis 11 Null.

IV. Chronische Toluylendiaminvergiftung mit Milzexstirpation.

Der Parallelhund von 14,5 kg mit Milzexstirpation vom 22. XII. 1911 wurde an den gleichen Tagen mit gleichen Mengen vergiftet. Er wurde getötet am 10. II. 1912. Der Ikterus trat später auf und war geringer als beim Hunde mit Milz. Die Verfettung der Leber war nicht ganz so stark wie beim Hunde mit Milz, dagegen war auffallend die starke Abmagerung und Freßunlust des Tieres, die kaum auf die überstandene Operation als solche zurückzuführen ist, da der Blutverlust dabei sehr gering war und die Wunde gut heilte. Die Leber wog 360 g, 100 g Brei ergaben 1,24 g Ätheracetonrückstand. Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 3 komplett, 4 partiell; nach 4 Stunden 1 bis 4 komplett, 5 Spuren, 6 bis 11 Null.

Zur Übersicht will ich die bisherigen Resultate zusammenstellen.

	Gewicht des Rückstandes g	Hämolyse nach 2 Stunden	Hämolyse nach 4 Stunden
Normal	0,71	1 bis 3 komplett	5 partiell
Autolysiert	2,22	1 „ 8 „	9 komplett
Toluylendiamin akut .	3,15	1 „ 5 „	7 partiell
Tol. akut mit Milzexstirpation	3,79	1 „ 5 „	6 partiell, 7 Spuren
Tol. chronisch	1,51	1 „ 4 partiell	5 kompl., 6 „
„ „ mit Milzexstirpation	1,24	4 komplett	5 Spuren

Es geht aus dieser Zusammenstellung hervor, daß die normale Leber nur wenig hämolytische Substanzen besitzt. Entsprechend dem niedrigen Gewicht des Rückstandes und dem niedrigen hämolytischen Grenzwert. Ganz anders dagegen verhält sich die autolysierte Leber. Rückstand und Grenzwert steigen sehr stark. Dieser Unterschied in der Hämolyse ist auffallend. Es drängt sich dabei die Frage auf: sind in den Organen, d. h. in unserm Falle in der Leber, des Lebenden überhaupt schon hämolytische Stoffe vorhanden oder entstehen diese erst bei der Autolyse? Daß in der normalen Leber hämolytische Stoffe vorhanden sind, geht aus dem oben angeführten Normalversuch und aus den früheren Untersuchungen von Metschnikoff, Morgenroth und Korschun und Friedemann hervor. Es besteht aber trotzdem ein wesentlicher Gegensatz zwischen normalen und autolysierten Lebern vor allem in quantitativer, aber auch in qualitativer Beziehung. Bei der Autolyse treten, wie von Waldvogel, Friedemann bereits festgestellt ist, in großer Menge alkohollösliche Substanzen auf. Friedemann hält diese Substanzen für Umwandlungsprodukte des Lecithins, die den Charakter der Toxolecithide haben analog der Kobralecithidbildung bei der Vergiftung mit diesem Schlangengift und nimmt an, daß dieser Vorgang einem lipolytischen Ferment zuzuschreiben sei, das unter normalen Verhältnissen nicht zur Wirkung kommt. Auch Waldvogel[1]) vertritt eine ähnliche Auffassung. Joannovics und Pick erkennen eine Lecithidbildung nicht an, sondern meinen, daß bei

[1]) Waldvogel, Centralbl. f. Stoffwechsel- u. Verdauungskrankh. 4, 10, 1903; Virchows Arch. 77, I, 1904; Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 200, 1904; Deutsch. Arch. f. klin. Med. 82, 437, 1905.

der Autolyse der Leber die an sich nicht hämolytisch wirkenden Lipoide in stark hämolytisch wirkende Fettsäuren übergehen. Jedenfalls ist sicher, daß die Hämolysine der normalen Organe chemisch different sind von denen der autolysierten.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, kann ich die Resultate von Joannovics und Pick hinsichtlich des Hämolysinwertes der Leber nach akuter und chronischer Toluylendiaminvergiftung bestätigen. Der Leberextrakt bei akuter Vergiftung ist dem bei chronischer an hämolytischer Wirksamkeit bedeutend überlegen. Gleichzeitig ist die Menge des Leberextraktes im ersten Falle beträchtlich vermehrt. Wie bereits Joannovics und Pick gefunden haben, treten bei der akuten Vergiftung trotz fehlender makroskopisch und mikroskopisch sichtbarer Verfettung in der Leber Lipoidstoffe von niederer Jod- und Säurezahl auf, die entsprechend ihren Löslichkeitsbedingungen in Äther, Aceton und Methylalkohol den niederen Fettsäuren zuzurechnen sind. Bei der chronischen Vergiftung finden sich im Gegensatze hierzu höhere Fettsäuren, die dem nach der Leber aus den Fettdepots geschafften Neutralfett entstammen und die makroskopisch schon erkennbare Verfettung bewirken. Ganz zweifellos handelt es sich hierbei um einen sekundären Vorgang, der in seiner Intensität abhängig ist von der Dauer und dem Grad der Vergiftung, ferner von dem Fettgehalt des Versuchstieres. Aus diesen drei Momenten erklärt sich der in meinem Versuche und in den Versuchen von Joannovics und Pick vorhandene geringere Gehalt an Fettsubstanz bei der chronischen Vergiftung. Das Maximum der Verfettung wird, wie aus alten Versuchen von Rosenfeld und anderen bekannt ist, nach mehreren Tagen erreicht. In den Versuchen von Joannovics und Pick nach 5 bis 6 Tagen. Alsdann sind die Reservedepots bereits ziemlich erschöpft und der Fettgehalt der Leber nimmt wieder ab. Z. B. ist er bei den Versuchstieren von Joannovics und Pick am 21. Tage bedeutend gesunken. Es läßt sich somit der geringere Extraktgehalt zwanglos aus der Abnahme des Gesamtfettes im Körper erklären. Wie steht es aber mit der Abnahme der hämolytischen Wirksamkeit? Joannovics und Pick meinen, daß bei der akuten Vergiftung nach 12 Stunden die größte Menge der hämolytischen Substanz noch in der Leber gefunden wird, weil

sie noch nicht ins Blut abgegeben und daher von den Blutkörperchen noch nicht verankert sei, während bei der chronischen Vergiftung die hämolytische Substanz bereits von den Erythrocyten gebunden sei und infolgedessen nicht mehr in dem Leberextrakt gefunden würde. Damit stimmt nicht überein die Tatsache, daß bei der über 21 Tage ausgedehnten Vergiftung der hämolytische Wert wieder größer geworden ist, obwohl die Gesamtextraktmenge abgenommen hat. Hier müssen noch andere Ursachen in Erwägung gezogen werden. Zunächst könnte sein, daß bei der chronischen Vergiftung infolge allmählich eintretender, aber geringerer Schädigung der Leberzellen weniger hämolytische Stoffe überhaupt gebildet werden, da selbstverständlich die Zerstörung der Organzellen eine geringere ist. Es ist aber auch zu erwägen, daß das Toluylendiamin durch das Transportfett gebunden und dadurch von dem Angriff auf die Leberzellen abgelenkt wird. Die Bedeutung der Fettinfiltration als Schutz- und Abwehrvorgang bei Vergiftungen ist bereits von Rosenfeld erwähnt worden. Dafür spricht vor allem die Wechselbeziehung zwischen Glykogengehalt und Fettgehalt der Leber. Mit dem Schwinden des Glykogens in den Leberzellen bei Vergiftungen wandert Fett ein, und wenn es gelingt, durch Zuckerfütterung Glykogenmast zu erzielen, schwindet das Fett wiederum. Mit der Bindung des Giftes durch das eingewanderte Fett wird seine schädliche Wirkung eingedämmt, und das scheint mir auch in der Tat die plausibelste Erklärung für die geringere Hämolyse des Leberextraktes bei der chronischen Toluylendiaminvergiftung zu sein, und auch für die Beobachtung, daß bei sehr lange dauernder Vergiftung schließlich doch der hämolytische Effekt wieder zunimmt. In diesem Falle kam eben infolge des eingetretenen Fettschwundes, der sich schon in dem äußeren Verhalten der Tiere kundgibt, schließlich doch eine erheblichere Zerstörung von Protoplasma zustande, die Lipoide von hämolytischer Wirksamkeit freimacht. Es geht aus alledem hervor, daß die hämolytischen Stoffe aus den Lipoiden der Organzellen entstehen und daß das Transportfett für die Hämolyse nicht oder nur insoweit in Betracht kommt, als ihm Organlipoide beigemengt sind oder freie, höhere Fettsäuren wie die Ölsäure, deren hämolytische Fähigkeit bewiesen ist, beim Transport auftreten. Weiter

zeigt sich aber auch hier wieder, daß die Verfettung der Organe kein einheitlicher Prozeß ist, sondern sich aus zwei Vorgängen zusammensetzt: dem Freiwerden der Organlipoide infolge Schädigung der Organzellen, indem das lipoidlösliche Gift mit den Lipoiden der Zellmembran in Reaktion tritt (Mohr), und dem Transport von Neutralfett aus den Fettdepots, der sekundärer Natur und gleichzeitig Folge der Inanition und Abwehrvorrichtung ist.

In den Rahmen dieser Anschauung passen nun auch die Versuchsergebnisse, die wir bei der Phosphorvergiftung erhalten haben und die wir hier vor Besprechung der Ergebnisse der Milzexstirpation einschalten wollen.

V. Akute Vergiftung mit Phosphor.

Zur akuten Vergiftung wurde ein 6,2 kg schwerer Hund gewählt. Er wurde mit 0,15 g Phosphor per os vergiftet und nach 24 Stunden getötet, da nach dieser Zeit das Paralleltier mit Milzexstirpation spontan starb. Ein Ikterus war nicht vorhanden, die Leber war makroskopisch nicht verändert, verarbeitet wurden 100 g Brei. Der Ätheracetonrückstand betrug 1,55 g. Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 3 komplett, 4 partiell, 5 Spuren; nach 4 Stunden 4 komplett, 5 partiell, 6 Spuren, 6 bis 11 Null.

VI. Akute Phosphorvergiftung mit Milzexstirpation.

Der Parallelhund von 8,2 kg Gewicht wurde 7 Tage nach der Milzexstirpation mit 0,2 g Phosphor vergiftet. Der Tod erfolgte nach 24 Stunden. Es war kein Ikterus vorhanden, stellenweise geringe Verfettung der Leber. Die Leber wog 335 g, verarbeitet wurden 100 g. Der Ätheracetonrückstand betrug 4,8 g. Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 4 komplett, 5 bis 6 Spuren; nach 4 Stunden 5 komplett, 6 partiell, 7 bis 11 Null.

Bei der akuten Phosphorvergiftung ist also der hämolytische Wert erhöht. Auffallend ist der hohe Lipoidgehalt der Leber des milzexstirpierten Hundes.

VII. Chronische Phosphorvergiftung.

Ein normaler Hund von 6,5 kg Gewicht wurde in toto mit 0,01 g Phosphor per os vergiftet, und zwar am 11. I. mit 0,005 g, am 16. I. mit 0,005. Der Hund wurde getötet am 23. I., da das Paralleltier starb. Es war kein Ikterus vorhanden, die Leber verfettet. Das Gewicht der Leber betrug 130 g, verarbeitet wurden 100 g, der Rückstand betrug 7,40 g. Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 4 komplett, 5 bis 6 partiell, 6 bis 11 Null; nach 4 Stunden 1 bis 5 komplett, 6 bis 11 Null.

VIII. Chronische Phosphorvergiftung mit Milzexstirpation.

Als Paralleltier diente ein 6,8 kg schwerer Hund, der 14 Tage nach der Milzexstirpation mit 0,01 g Phosphor in toto vergiftet wurde, und

zwar am 11. I. mit 0,005 g, am 16. I. mit 0,005 g. Der Tod erfolgte am 22. I. Der Hund zeigte ähnlich wie der analoge Toluylendiaminhund eine große Freßunlust und starke Abmagerung. Ein Ikterus war nicht aufgetreten, die Leber war verfettet. Das Gewicht der Leber betrug 165 g, verarbeitet wurden 100 g Brei, der Rückstand betrug 2,87 g. Die Hämolyse war nach 2 Stunden 1 bis 6 komplett, 7 bis 8 partiell, 9 bis 11 Null; nach 4 Stunden 1 bis 8 komplett, 9 Spuren, 10 bis 11 Null. Hierbei ist der hohe hämolytische Grenzwert und der geringe Gehalt an Lipoidstoffen auffallend.

Klinisch war bei den Phosphorvergiftungen im Gegensatz zu den Toluylenvergiftungen auffallend, daß die milzexstirpierten Tiere anscheinend geringere Giftdosen vertragen als die milztragenden Hunde, während bei den toluylendiaminvergifteten Hunden das umgekehrte Verhalten vorlag.

Zur Übersicht will ich die gefundenen Werte bei der Phosphorvergiftung zusammenstellen:

	Rückstand	Hämolyse nach 3 Std.	Hämolyse nach 4 Std.
Phosphorvergiftung akut	1,55	1 bis 4 partiell	5 partiell
" " mit Milzexstirpation	4,80	5 partiell	5 komplett 6 partiell
Phosphorvergiftung chron.	7,40	5 partiell	5 komplett
" " mit Milzexstirpation	2,87	6 komplett 7 bis 8 partiell	8 komplett

Gleichzeitig will ich auch die Ergebnisse der chronischen Toluylendiaminvergiftungen mit und ohne Milzexstirpation und die der chronischen Phosphorvergiftungen mit und ohne Milzexstirpation zur Übersicht zusammenstellen:

	Rückstand	Hämolyse
Toluylendiamin chronisch	1,51	5 komplett
" " mit Milzexstirpation	1,24	4 komplett
Phosphor chronisch	7,40	5 komplett
" " mit Milzexstirpation	2,87	8 komplett

Aus der Zusammenstellung ist ersichtlich, daß trotz Vermehrung des Lipoidgehaltes der hämolytische Wert bei der akuten und chronischen P-Vergiftung geringer ist als bei der

Toluylendiaminvergiftung. Dabei ist bei der akuten Vergiftung auch der Lipoidgehalt bedeutend geringer als bei der entsprechenden Vergiftung mit Toluylendiamin. Daraus läßt sich schon auf eine verschiedene Wirkungsweise der beiden Gifte auf das Protoplasma schließen und läßt sich gerade auch die Differenz in der Beeinflussung des Blutes durch die beiden Gifte verstehen. Bei der akuten P-Vergiftung pflegen hämolytische Erscheinungen in größerem Maßstabe zu fehlen, während sie bei der Tol.-Vergiftung die Regel sind. Noch charakteristischer ist der Befund bei der chronischen P-Vergiftung. Trotzdem der Lipoidgehalt um das Vielfache vermehrt ist, zeigt sich keine Zunahme des hämolytischen Wertes. Es handelt sich eben hier, wie aus der klinischen Beobachtung des Versuchstieres hervorgeht, um eine hochgradige Inanition und dadurch bedingten Fetttransport nach der Leber. Die hierbei in die Leber geschafften Lipoide haben aber keine oder nur geringe hämolytische Eigenschaften, wie schon bei der chronischen Tol.-Vergiftung nachgewiesen wurde. Diese Gegensätzlichkeit von Toluylendiamin und Phosphorvergiftung in biologischer Beziehung beleuchtet scharf die Unterschiede in dem Verhalten des Blutes in morphologischer Beziehung. Bei der ersteren akute und fortschreitende Anämie, bei der letzteren im Gegenteil, sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Vergiftung keine Verminderung, gelegentlich sogar in klinischen Fällen eine Vermehrung der roten Blutkörperchen. Die gegensätzliche Wirkung beider Gifte ist aber gleichzeitig auch eine Stütze für die Ansicht, daß in der Tat die bei der Fettdegeneration auftretenden Hämolysine von bestimmtem chemischen Charakter auch in vivo für die Blutkörperchenzerstörung in Frage kommen. Denn wir finden bei dem starken Blutgift Toluylendiamin, bei der akuten Vergiftung niedere Fettsäuren mit starker hämolytischer Wirksamkeit in größerer Menge als bei der akuten P-Vergiftung, und bei der chronischen P-Vergiftung trotz vielfacher Vermehrung des Neutralfettes in der Leber geringe hämolytische Wirkung.

Erwähnt muß werden, daß für die Beurteilung der Verhältnisse die akute wichtiger als die chronische Intoxikation ist. Zunächst ist der Grad der Verfettung natürlich abhängig von dem Ernährungszustand, der bei der P-Vergiftung

rascher leidet, da die Nahrungsaufnahme bei den Tieren bald schlecht wird, während Hunde, die mit Tol. vergiftet sind, oft gute Freßlust zeigen und infolgedessen langsamer abmagern. Ferner tritt eine gewisse Gewöhnung an die Giftzufuhr und damit eine Abschwächung ihrer Wirkung ein. Toluylendiamin vertragen die Tiere selbst in größeren Mengen ziemlich lange. Von Bedeutung scheint ferner der Einfluß der Milz zu sein.

Joannovics und Pick haben beobachtet, daß die Bildung der Hämolysine bei der chronischen Tol.-Vergiftung durch die Entfernung der Milz gehemmt wird, gleichzeitig haben sie bemerkt, daß milzlose Hunde eine größere Widerstandsfähigkeit gegen das Gift haben als Normaltiere. Wir können, wie die Tabelle auf S. 335 zeigt, dies bestätigen, ebenso daß die Milzexstirpation auf die akute Vergiftung keinen Einfluß hat. Sehr merkwürdig ist in dieser Beziehung das Verhalten bei der P-Vergiftung. Hierbei ist zweierlei auseinanderzuhalten. Erstens das quantitative Verhalten der Lipoide und zweitens die hämolytische Wirksamkeit der Extrakte. Bei der akuten P-Vergiftung des milzlosen Hundes nimmt die Extraktmenge beträchtlich zu. Der Hund hat nach der Milzexstirpation, obwohl der Wundverlauf ein glatter war, schlecht gefressen und magerte bedeutend ab. Die Zunahme des Lipoidgehaltes ist in erster Linie und wahrscheinlich ausschließlich auf den dadurch gesteigerten Fetttransport zurückzuführen. Dafür spricht auch, daß die hämolytische Wirksamkeit nicht zugenommen hat, denn die Hauptmasse der Lipoide besteht in diesem Falle, wie oben auseinander gesetzt wurde, aus höheren Fettsäuren, die als Hämolysine erst in zweiter Reihe in Frage kommen. Anders ist es bei der chronischen P-Vergiftung des milzlosen Hundes. Auch dieses Tier war nach der Milzexstirpation bedeutend abgemagert. Infolge der längeren Inanition war aber der Fettschwund so stark, daß der Fetttransport bereits nachließ, daher die Verringerung des Lipoidgehaltes in der Leber. Da aber bei der geringen Menge des Gesamtextraktes der hämolytische Wert ein höherer geworden ist, muß man in Konsequenz der bisherigen Resultate annehmen, daß in dem Lipoidextrakt größere Mengen von Organhämolysinen enthalten sind, mithin bei dem milzlosen Tier das Fehlen der Milz besondere chemische Veränderungen in der Leber begünstigt hat.

Es liegt hier demnach ein Unterschied gegenüber Toluylendiaminvergiftung vor. Ein solcher macht sich auch darin bemerkbar, daß die milzlosen P-Hunde weniger widerstandsfähig gegen die chronische P-Darreichung waren, als die milzlosen Tol.-Hunde.

Die Frage, ob hierin eine besondere, spezifische Funktion der Milz zu sehen ist, kann ich nicht entscheiden, möchte sie aber doch eher verneinen. Joannovics und Pick scheinen anzunehmen, daß die Milz in spezifischer Weise hemmend auf die Hämolysinbildung bei der chronischen Toluylendiaminvergiftung wirkt. Es ist aber sehr wohl möglich, daß der geringere Lipoidgehalt der Leber des milzlosen Hundes eine Folge der nach der Milzexstirpation aufgetretenen Ernährungsstörung ist. Wenigstens sind meine milzlosen Tiere ziemlich rasch abgemagert und in einem erheblich reduzierten Zustand in die Vergiftung eingetreten. Das scheint auch bei den Versuchstieren von J. und P. der Fall gewesen zu sein, wie man aus dem Vergleich der Zahlen für das Neutralfett der Leber schließen kann. Bei meinem Versuch mit P-Vergiftung, wo nach der Milzexstirpation der hämolytische Wert höher war als bei dem Kontrolltier, nur die Gesamtextraktmenge niedriger, möchte ich bestimmt annehmen, daß es sich um eine Folge des schlechteren Ernährungszustandes handelt. Infolge der Inanition nach der Milzexstirpation kam es zu einem starken Fettschwund, das Transportfett an der Leber nahm ab, und dadurch kam es zu einem starken Zerfall des Organs mit Freiwerden von Organlipoiden mit starker hämolytischer Wirksamkeit.

Wenn sonach festgestellt ist, daß bei der Wirkung von Blutgiften hämatoxische Stoffe in den Organen entstehen, so ist damit zwar die Möglichkeit gegeben, daß dadurch Zerstörung von roten Blutkörperchen resultieren kann. Ob sie in der Tat stattfindet, hängt in erster Linie davon ab, daß diese Substanzen in wirksamer Menge ins Blut kommen. Obwohl die größte Wahrscheinlichkeit dafür spricht, daß dies der Fall ist, so fehlt dafür doch bisher der Beweis.

Jastrowitz fand in noch nicht veröffentlichen Versuchen mittels quantitativer Analyse des Blutes, daß die Gesamt-Lipoide des Blutes bei der Einwirkung hämolytischer Gifte meistens zunehmen. Einen anderen Weg des

Nachweises haben wir eingeschlagen unter Benutzung der Methode von Abderhalden[1]) zum Nachweis von Fermentwirkungen im Blute. Obwohl die Versuche noch nicht abgeschlossen sind, soll hier vorläufig ein solcher Versuch mitgeteilt werden. Abderhalden und seine Mitarbeiter haben nachgewiesen, daß bei parenteraler Einverleibung von (körper- und blutfremdem) Eiweiß, Fett und Rohrzucker das Blutserum die Fähigkeit bekommt, diese Körper zu spalten. Eine große praktische Bedeutung hat diese Entdeckung bereits bei der serologischen Diagnose der Schwangerschaft gewonnen. Hierbei läßt sich auf optischem Wege nachweisen, daß das Blutserum imstande ist, placentares Eiweiß zu spalten, was sich in der Zunahme des Drehungsvermögens der Mischung von Serum mit placentarem Eiweiß zeigt. Auch bei der parenteralen Einverleibung von Fett sowie im Hunger tritt im Blutserum Fettspaltung auf, die normalerweise nicht vorhanden ist (Abderhalden und Rona, Abderhalden und Lampé[2]). Die Frage liegt nahe, ob der Übergang von Fetten auf diese Weise bei pathologischen Organverfettungen nachweisbar ist. Das Fettspaltungsvermögen wird mit Hilfe von Tributyrin festgestellt. Die Spaltung dieses Glycerids durch die entsprechenden Blut- resp. Serumproben erfolgte bei 25°. Es wurden zu je 50 ccm Esterlösung, 0,5 ccm Blut resp. 1,0 ccm Serum hinzugefügt, außerdem zu jeder Probe 1 ccm einer Phosphatlösung, die aus einem Teil $^1/_3$ normal primärem Phosphat und zwei Teilen $^1/_3$ normalem sekundären Phosphat hergestellt wurde; dadurch war es möglich, den ganzen Verlauf der Fermentspaltung bei einer konstant gehaltenen H-Konzentration von ca. $1 \cdot 10^{-7}$ zu beobachten. Bisher konnten wir nur wenige Versuche ausführen, die wir mit dankenswerter Unterstützung von Herrn Dr. Lampé, Assistenten am physiologischen Institut, angestellt haben. Der Versuch gestaltete sich folgendermaßen. Nachdem der 6,5 kg schwere Hund in 2 Tagen 0,5 g Toluylendiamin bekommen hatte, wurden ihm aus der Vena jugularis 20 ccm Blut entnommen. 1 ccm des Blutserums wurde nach der oben angegebenen Methode untersucht.

---

[1]) Abderhalden und Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75, 30.

[2]) Abderhalden und Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75, 30. — Abderhalden und Lampé, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 396.

Die Änderung der Oberflächenspannung wurde mittels des Michaelis-Ronaschen Tropfröhrchens verfolgt.

11^{45}	182 Tropfen	in	58,2 Sek.
12^{05}	180 „	„	58,2 „
12^{25}	179 „	„	58,0 „
12^{45}	178 „	„	58,0 „
1^{05}	178 „	„	58,0 „
1^{25}	177 „	„	58,0 „
1^{45}	176 „	„	58,0 „
2^{05}	172 „	„	58,0 „
4^{00}	172 „	„	58,0 „

Es ergab sich folgende Kurve (Fig. 1).

Die Abszissen stellen die Zeit in Minuten, die Ordinaten die Mengen Tributyrin in Prozenten der gesättigten Lösungen dar.

Bemerkenswerterweise ist bei Hunden mit länger dauernder Vergiftung eine Zunahme des Fettspaltungsvermögens nicht festgestellt worden. Die Ursache könnte in einer Erschöpfung der Fermentproduktion bei den vergifteten Tieren liegen. Es könnte aber auch an dem auffälligen Verhalten der chronisch mit Tol. vergifteten Tiere liegen, auf das schon hingewiesen ist. Wenn auch vorläufig dieser Befund nicht erklärt werden kann, so ist doch die Tatsache, daß bei der akuten Tol.-Vergiftung das Blut serumspaltende Eigenschaften bekommt, ein interessanter Befund, der weiteren Studiums würdig ist.

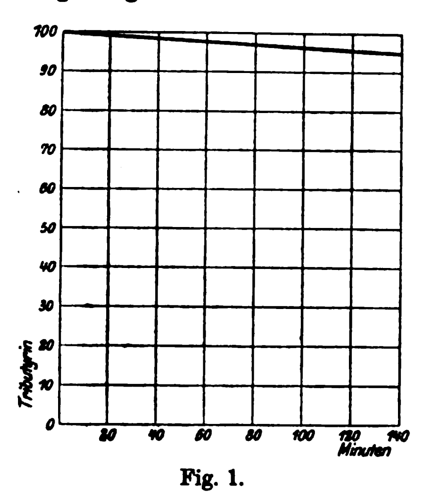


Fig. 1.

Zusammenfassung.

Fassen wir die Ergebnisse der Untersuchungen bei Toluylendiamin- und Phosphorvergiftungen zusammen, so ergibt sich folgendes:

1. Bei akuten Tol.- und P-Vergiftung steigt der hämolytische Grenzwert. Die Hämolysine sind bei diesen Intoxikationen durch Milzexstirpation nicht beeinflußbar.

2. Bei der subakuten resp. chronischen Tol.- und P-Vergiftung hat die Hämolyse einen normalen Wert.

3. Bei der chronischen Tol.-Vergiftung sinkt dieser hämolytische Wert nach der Milzexstirpation. Bei der chronischen P-Vergiftung steigt er nach Milzexstirpation. Das hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß nach der Milzexstirpation infolge der Inanition in die Leber wenig hämolytisch wirksames Depotfett transportiert wird; der höhere hämolytische Wert bei der P-Vergiftung erklärt sich aus einem stärkeren Organzerfall infolge weiter fortgeschrittener Inanition.

4. Wirksame hämolytische Substanzen entstehen nur bei der Fettdegeneration. Die bei der Fettinfiltration in der Leber in geringer Menge vorhandenen Lipoidstoffe haben nur wenig hämolytische Eigenschaften und kommen für die klinischen Formen der Hämolyse nicht in Betracht.

Die Bedeutung der Wasserstoffionen für die Milchgerinnung[1]).

Von

O. Allemann.

(Aus der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern.)

(Eingegangen am 4. August 1912.)

Vor einigen Jahren hat W. van Dam[2]) erstmals auf die Bedeutung physikalisch-chemischer Untersuchungsmethoden für die Milchchemie hingewiesen. In der betreffenden Veröffentlichung befaßt sich der Autor mit dem Säuregehalt der Milch und seiner Beziehung zur Labgerinnungszeit.

Durch Zusatz verschiedener Mengen Salzsäure resp. Kalilauge zur Milch hat er deren Säuregrad verändert und sodann in den einzelnen Proben die Labgerinnungszeit und die Konzentration der aktuellen Ionen ermittelt. Dabei konnte folgende Beziehung zwischen Labgerinnungszeit und H-Ionenkonzentration festgestellt werden:

Die Geschwindigkeit der Labgerinnung ist direkt proportional der Konzentration der aktuellen Wasserstoffionen.

Von anderer Seite wurde diese These jedoch abgelehnt, so daß es wichtig erschien, die ganze Frage wiederum aufzurollen und einer nochmaligen Bearbeitung zu unterziehen.

---

[1]) Nach einem am 30. Mai 1912 in der Jahresversammlung des Vereins schweizerischer analytischer Chemiker in Zürich gehaltenen Referate.

[2]) W. van Dam, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 295.

Bekanntlich wird allgemein angenommen, daß die Geschwindigkeit der Labgerinnung vom Säuregrad[1]) der Milch abhängig sei. Diese Auffassung trifft aber speziell bei frischer Milch nur bedingterweise zu, indem, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist, es Milch geben kann, die trotz des relativ hohen Säuregrades eine lange Gerinnungszeit hat, und umgekehrt. Das gleiche Verhältnis ist auch bei den aktuellen Ionen[2]) zu beobachten.

Es besteht also sowohl bezüglich des Säuregrades als auch der H-Ionenkonzentration eine nur mangelhafte Beziehung mit der Gerinnungsgeschwindigkeit, insofern man Milch verschiedener Tiere mit derselben Lablösung prüft.

Zur Illustration des Angeführten diene folgende Zusammenstellung:

Tabelle I.

Milch von Kuh	Säuregrad ccm NaOH $^0/_0$	H-Ionenkonzentration $CH . 10^{-7}$	Labgerinnugszeit
Spyri	5,4	4,12	8 Min. 40 Sek.
Rundi	5,3	3,00	11 „ 52 „
Bläß	5,8	2,79	15 „ 36 „
Lerche	5,8	1,72	19 „ 28 „
Gemse	6,8	3,98	10 „ 14 „
Moosi	4,8	1,24	15 „ 32 „
Goldi	7,6	1,84	14 „ 21 „
Venner 1	5,9	1,41	17 „ 43 „
Dachs	7,0	3,03	11 „ 35 „
Wachtel	5,1	1,29	9 „ 47 „
Venner 2	5,8	1,94	15 „ 38 „
Taube 1	6,2	1,79	12 „ 50 „
Prinz	8,2	3,45	8 „ 6 „
Gretli	7,2	1,84	17 „ 29 „

Um nun zu untersuchen, welche von den beiden Größen — Säuregrad oder H-Ionenkonzentration — von Bedeutung

---

[1]) Die potentiellen Wasserstoffionen können zusammen mit den aktuellen titrimetrisch bestimmt werden; die Anzahl der für 100 ccm Milch verbrauchten ccm $^n/_4$-Lauge ergibt dann den Säuregrad.

[2]) Die aktuellen H-Ionen kann man auf verschiedene Weise bestimmen; für die Verhältnisse, wie sie in der Milch vorliegen, eignet sich am besten die Methode der Gasketten. Eine sehr gute Beschreibung dieser Methode gibt Michaelis im Handbuch für biochemische Arbeitsmethoden und Bottazzi in Neubergs Handbuch „der Harn“.

bei der Labgerinnung sei, wurde Milch verschieden stark mit Säure angesäuert. Die zur Ansäuerung verwendeten Säuren wurden in äquivalenter Konzentration verwendet — das Verhältnis Milch zu Säure war dabei wie 10:1. Betrachten wir einzig die Resultate, wie sie mit Salzsäure und Essigsäure erhalten wurden. Diese beiden Säuren enthalten bei der gleichen Molkenzentration die gleiche Summe potentieller und aktueller Ionen, neutralisieren demnach gleichviel Lauge, dagegen unterscheiden sie sich sehr durch ihren Gehalt an aktuellen Wasserstoffionen. Da nun die Geschwindigkeit, mit der eine chemische Reaktion zustande kommt, im Verhältnis zur Zahl der aktuellen Ionen steht, müßte die Beeinflussung der Labgerinnung eine sehr verschiedene sein bei den beiden Säuren. Andererseits müßten, wenn die Annahme, daß die H-Ionen den maßgebenden Faktor bilden, richtig ist, isohydrische Lösungen die Reaktionsgeschwindigkeit in gleicher Weise beeinflussen. Der Bequemlichkeit halber wurden nicht isohydrische Lösungen, sondern äquivalente Lösungen verwendet, die sich nicht durch die Gleichheit der Wirkungen, sondern durch ihre Verschiedenheit auszeichnen sollten. Unter Außerachtlassung des natürlichen Säuregrades der Milch wurden die Proben mit solchen Säuren versetzt, bis der Säuregehalt der Milch demjenigen einer $^1/_{100}$, $^1/_{200}$, $^1/_{500}$ und $^1/_{1000}$ normalen Säure entsprach. In bezug auf den Säuregrad zeigte also die Milch jeder Verdünnung den entsprechenden Wert, dagegen mußte die H-Ionenkonzentration verschieden sein, demzufolge natürlich auch die Reaktionsgeschwindigkeit. Je nachdem die Gerinnungsgeschwindigkeit dem Säuregrad oder der H-Ionenkonzentration parallel ging, mußten die Resultate außerordentlich differieren.

Die Ergebnisse, die bei dieser Anordnung mit Salzsäure und Essigsäure erhalten wurden, sind in folgender Tabelle II niedergelegt.

Betrachtet man diese Resultate, so erkennt man, daß die Voraussetzungen nicht den Tatsachen entsprechen, indem die Zahlen der in der Milch vorhandenen aktuellen H-Ionen sowohl bei der stark hydrolysierten Salzsäure als auch bei der schwach gespaltenen Essigsäure durchaus miteinander übereinstimmen, und zwar trotz der verschiedenen H-Ionenmengen, die zugesetzt worden sind. Allerdings macht die Zahl der gefundenen

Tabelle II.

Äquivalent-konzentration der Milch	Salzsäure		Essigsäure			
	Berechn. H-Ionen CH . 10^{-3}	Gefund. H-Ionen CH . 10^{-7}	Labgerinnungszeit	Berechn. H-Ionen CH . 10^{-3}	Gefund. H-Ionen CH . 10^{-7}	Labgerinnungszeit
$^1/_{100}$ n.	9,6	5,8	8′ 26″	4,2	5,7	8′ 30″
$^1/_{200}$ n.	4,8	3,5	13′ 29″	2,1	3,5	13′ 25″
$^1/_{500}$ n.	1,96	2,2	22′ 30″	0,7	2,3	22′ 35″
$^1/_{1000}$ n.	0,96	2,1	29′ 0 ″	0,13	2,1	29′ 10″
Wasser	—	1,75	34′ 40″	—	1,77	34′ 45″

Ionen nur einen verschwindend kleinen Bruchteil der zur Milch zugesetzten Ionen aus. Die Erklärung für diese Tatsache ist offenbar darin zu suchen, daß die Milch ein sehr großes Vermögen besitzt, als Reaktionsregulator zu fungieren; dabei werden sowohl die aktuellen als auch die potentiellen Ionen gebunden, und was wir nachher als freie Ionen messen, ist nichts anderes als die durch die Verschiebung der Phosphate der Milch nach der sauren Seite hin zugunsten des primären Phosphats neugebildeten Ionen. Daß dieses der Fall ist und daß nicht etwa das Casein als Ionenlieferant zu betrachten ist, geht unzweifelhaft daraus hervor, daß die Zahl der aktuellen H-Ionen in der Milch und dem daraus mit Lab bereiteten Serum keine nennenswerten Unterschiede aufweist, während andererseits der Säuregrad um mehr als ein Drittel abnimmt.

Tabelle III.

	1. Versuch		2. Versuch	
	Säuregrad	H-Ionen-konzentrat.	Säuregrad	H-Ionen-konzentrat.
Milch	5,9	$2{,}08 \cdot 10^{-7}$	7,4	$4{,}45 \cdot 10^{-7}$
Molke	2,7	$2{,}08 \cdot 10^{-7}$	4,4	$4{,}43 \cdot 10^{-7}$

Daraus geht zweifellos hervor, daß bei der Labgerinnung keine Abnahme der Säure im Sinne aktueller Ionen statthat, und daß die bisherigen hierauf bezüglichen Meinungen zu modifizieren sind.

Der regulierende Faktor erleidet erst bei der Säuregerinnung, d. h. bei der H-Ionenkonzentration von $1{,}28 . 10^{-5}$,

entsprechend einer $^1/_{25}$ normalen Säure-Milchmischung eine Abnahme, hört aber jedenfalls erst bei dem Punkte der Umwandlung sämtlichen sekundären Phosphats in primäres Phosphat auf, d. h. bei ca. $2{,}0 \cdot 10^{-5}$.

Wie aus Tabelle II hervorgeht, verläuft die Reaktion durchaus im Sinne der zugesetzten Säuremenge (Säuregrad), allerdings findet man den nämlichen Parallelismus auch bei den gefundenen H-Ionen wieder, und man wäre im Zweifel zu entscheiden, welchem von den beiden Werten die größere Bedeutung zukomme. Zu einer solchen Frage ist man jedenfalls berechtigt, und wenn bedacht wird, daß die Zahl der freien Ionen nur einen kleinen Bruchteil der gebundenen Ionen darstellt, ist man versucht, letzteren die größere Bedeutung beizumessen und den ganzen Vorgang als eine Absättigung basischer Gruppen zu betrachten. Auch Versuche mit andern Säuren und namentlich auch solche, die mit Gemischen von primärem und sekundärem Natriumphosphat von bestimmten Ionenkonzentrationen durchgeführt wurden, ergaben ähnliche Resultate. Nur die mit Weinsäure erhaltenen wichen anfänglich, d. h. bis zu $^1/_{500}$ normal, von den übrigen ab, indem eine geringe Hemmung der Labwirkung zu konstatieren war; bei den weiteren Verdünnungen war eine solche nicht mehr zu erkennen.

Zur Illustration des Gesagten seien die mit den Phosphatgemischen erhaltenen Ergebnisse wiedergegeben. Die Milch wurde mit je 10% Gemisch von $^1/_1$ n-Stärke in den folgenden Verhältnissen versetzt und darin einerseits die H-Ionen und andererseits die Labgerinnungszeit ermittelt (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Primäres Phosphat	Sekundäres Phosphat	H-Ionen-berechnet	H-Ionen gefunden	Labgerinnungszeit
32 :	1	$6{,}4 \cdot 10^{-6}$	$1{,}71 \cdot 10^{-6}$	1′ 40″
8 :	1	1,6	$5{,}9 \cdot 10^{-7}$	3′ 7″
2 :	1	0,4	4,48	4′ 19″
1 :	1	0,2	2,58	7′ 34″
1 :	2	0,1	1,99	11′ 9″
1 :	32	$0{,}61 \cdot 10^{-8}$	1,10	25′ 0″
Wasser		—	1,52	7′ 30″

Trotzdem in diesem Versuche die Labgerinnungszeit proportional der H-Ionenkonzentration verläuft, läßt sich doch nicht ohne weiteres auf die ausschlaggebende Wirkung der H-Ionen an der Reaktion schließen, weil die vorhandenen Ionen nicht genügt haben würden, die Einflüsse der Milcheiweißstoffe und der Milchsalze zu eliminieren.

Nachdem durch die angeführten und eine Reihe anderer Versuche keine endgültige Lösung der Frage einer Beteiligung der H-Ionen bei der Labgerinnung im Sinne eines entscheidenden Faktors erhalten werden konnte, wurde noch das von Michaelis[1]) empfohlene Natriumacetat-Essigsäuregemisch probiert. Mittels dieses Regulators mußte es möglich sein, die störenden Einflüsse der Phosphate, der Eiweißstoffe usw. auszuschließen. Die Versuchsbedingungen wurden in diesem Falle so gewählt, daß ein großer Überschuß an Säure, d. h. potentiellen Ionen vorhanden war, der in diesem Falle genügte, sämtliche bindungsfähigen Gruppen abzusättigen, ohne daß dadurch die Konzentration der Säure nennenswert verändert wurde. Auf diese Weise war es möglich, die Versuche unter bestimmten, den gewünschten H-Ionenkonzentrationen entsprechenden Verhältnissen anzustellen.

Zur Untersuchung bedient man sich am zweckmäßigsten der von Michaelis und Rona[2]) ausgearbeiteten Methode. Die Autoren beschreiben dieselbe folgendermaßen:

„In eine Reihe von Reagensgläsern werden verschiedene Gemische von Essigsäure und Natriumacetatlösung (molare Mengen) eingefüllt. Die Abstufungen von einer Röhre zur andern sind so eingerichtet, daß die Essigsäuremengen und somit auch die H-Ionenkonzentration in geometrischen Reihen zunehmen, damit der Sprung von einem Röhrchen zum nächst benachbarten überall in der Reihe dieselbe Bedeutung hat. Die Feinheit des Versuches wird durch die Feinheit der geometrischen Reihe variiert. Zunächst werden gröbere Reihen angesetzt, bei denen die benachbarten Glieder sich um das Doppelte der H-Ionenkonzentration unterscheiden, dann wird zu immer feineren Reihen vorgeschritten, so lange, als es überhaupt noch möglich ist einen Unterschied zwischen zwei benachbarten Gliedern festzustellen. Als praktische Reihe hat sich eine solche mit dem Exponenten 0,8 erwiesen.

Nachdem die verschiedenen Acetat-Essigsäuregemische in die Röhrchen eingefüllt sind, wird überall auf ein gleiches Volumen mit Wasser

[1]) Michaelis, Biochem. Arbeitsmethoden 3, 1340.

[2]) Michaelis und P. Rona, diese Zeitschr. 27, 39.

aufgefüllt und hernach je ein gleiches Volumen Milch hinzugesetzt und der Effekt beobachtet; man bemerkt dann in einigen Röhrchen eine sofortige Fällung oder aber eine bloße Trübung, die nach einiger Zeit noch an Stärke zunimmt.

Um den gewünschten Gehalt an H-Ionen zu erhalten, kann man die Mischungen auf zweierlei Arten herstellen; entweder werden verschiedene Mengen Essigsäure genommen und das Acetat unverändert gelassen, oder aber es werden gleiche Mengen Essigsäure verwendet und verschiedene Mengen Acetat genommen."

In den nachfolgenden Versuchen wurde die Essigsäure variiert, weil dann die Mengen der Elektrolyte konstant blieben und so Störungen durch verschiedene Elektrolytkonzentrationen ausschlossen. Das Natriumacetat ist $^1/_2$, $^1/_3$ und $^1/_4$ normal und die Essigsäure bei den entsprechenden Acetatkonzentrationen 10 mal schwächer, also $^1/_{20}$, $^1/_{30}$ und $^1/_{40}$ normal gewählt worden. Die Menge der Milch war 1 ccm, in zwei Fällen jedoch 10 ccm; im letzteren Falle wurde natürlich auch die Acetat-Essigsäuremenge und das Volumen des Wassers verzehnfacht. Zu jedem Röhrchen sind nachher noch 0,1 ccm Lablösung zugegeben worden.

Über die bei diesen Versuchen erhaltenen Gerinnungszeiten gibt die nachfolgende Tabelle Aufschluß.

Tabelle V.

	Röhrchen								Bemerkungen
	1	2	3	4	5	6	7	8	
$^n/_2$-Na-Acetat (ccm)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	××× = sofortige Ausfällung!
$^n/_{20}$-Essigsäure (ccm)	7,1	6,9	6,5	6,1	4,9	3,9	3,1	2,5	
$C_H . 10^{-5}$ (ccm) . . .	1,3	2,25	1,16	1,1	0,88	0,64	0,56	0,45	
Wasser (ccm)	1,9	2,1	2,5	2,9	4,1	5,1	5,9	6,5	
a) Vollmilch . . .	×××	5″	45″	67″	95″	210″	—	—	Je die 10 fache Menge $^n/_2$- u. $^n/_{20}$-Acetat.
b) Vollmilch . . .	×××	1′ 15″	2′ 35″	4′ 5″	10′	33′ 30″	—	—	
c) Magermilch . .	×××	< 2″	5″	10″	88″	—	—	—	
d) Caseinlösung .	—	27″	2′	5′ 30″	9′ 30″	12′	—	—	

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß die Labgerinnungszeit im Verhältnis zur H-Ionenkonzentration verändert wird. Denn hier kann es sich nicht um einen Neutralisationsvorgang handeln, weil die tatsächlich vorhandene Säuremenge genügt haben würde, sowohl die Phosphate als auch die Eiweißstoffe zu sättigen. Damit wäre der endgültige Beweis erbracht, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Labgerinnung

eine Funktion der aktuellen Wasserstoffionen ist, und es konnten die diesbezüglichen Befunde van Dams (l. c.) bestätigt werden.

Mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration nimmt auch die Geschwindigkeit der Labgerinnung zu. Diese Zunahme geschieht jedoch nur bis zu einer äußersten Grenze, bei der die H-Ionen schon für sich allein imstande sind, die Milch zur Koagulation zu bringen. Dieser Punkt liegt bei einer H-Ionenkonzentration von $1{,}3 \cdot 10^{-5}$ (Röhre 1) und entspricht also der nämlichen Konzentration, die eine momentan gerinnende Milch besitzt. Auffallend war bei dieser Konzentration, daß die Stärke der Säurefällung bei Vollmilch und Magermilch deutliche Unterschiede aufwies; während die Fällung bei Vollmilch einem Maximum entsprach, zeigte das Magermilchserum noch deutliche Opalescenz. Die Caseinlösung ergab hingegen keine Fällung, sondern nur eine schwache Trübung. In dem zweiten und den folgenden Röhrchen zeigten sich keine Fällungen mehr, sondern nur opalescierende Trübungen. Diese opalescierende Zone erstreckt sich bis zu Röhrchen 6, das einem H-Ionengehalt von $0{,}64 \cdot 10^{-5}$ entspricht; über Nr. 6 hinaus ist keine Veränderung der Röhrchen mehr bemerkbar, so daß man an einem Minimum angelangt ist. Die opalescierende Zone ist nun gerade diejenige, in der die Labgerinnung statthat.

Diese zonenweise Veränderung der Milch ist sehr auffallend, und namentlich deshalb auffallend, weil, wie Michaelis und Rona[1]) gezeigt haben, das Ausflockungsoptimum für Casein bei einer H-Ionenkonzentration von $2{,}0 \cdot 10^{-5}$ liegt. Vor kurzem haben Michaelis und Davidsohn[2]) berichtet, daß in einem Gemisch von Casein und genuinem Albumin das Flockungsoptimum nur eine unwesentliche Verschiebung erfährt. Der einzige Unterschied, den die Verfasser gegenüber Casein beobachten konnten, bestand in einem langsameren und weniger kräftigen Zusammenballen der Trübung, ein Umstand, den sie auf mechanische Wirkung des Albumins zurückführen.

Diese Resultate berechtigen zu der Annahme, daß Milch ein viel weiter nach der sauren Seite hin liegendes Fällungsoptimum haben müßte und nicht schon bei einer H-Ionen-

[1]) Michaelis und P. Rona, diese Zeitschr. 27, 39.

[2]) Michaelis und Davidsohn, diese Zeitschr. 39, 503.

Tabelle VIa.

	Röhrchen																	Bemerkungen
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
$^n/_3$-Acetat (ccm)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	× = Stärke der Ausscheidung. | = Stärke der diffusen Trübung.
$^n/_{30}$-Essigsäure (ccm)	8,9	8,5	8,1	7,7	7,3	7,1	6,9	6,5	6,1	4,9	3,9	3,1	2,5	2,0	1,6	1,3	1,02	
Wasser (ccm)	0,1	0,5	0,9	1,3	1,7	1,9	2,1	2,5	2,9	4,1	5,1	5,9	6,5	7,0	7,4	7,7	7,98	
CH. 10^{-5} (ccm)	1,61	1,53	1,47	1,36	1,31	1,29	1,25	1,16	1,1	0,88	0,64	0,56	0,45	0,36	0,29	0,29	0,19	
Milch (ccm)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
a) Vollmilch (je 1 ccm) sofort	×××	×××	×××	×××	×××	××	||	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	Von CH = 0,56 weg waren nach 24 Std. alle Röhrchen aufgerahmt.
n. 24 Std.	×××	×××	×××	×××	×××	×××	× |	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	
b) Vollmilch (je 1 ccm) sofort	×××	×××	×××	×××	×××	××	||	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	do.
n. 24 Std.	×××	×××	×××	×××	×××	××	× |	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	
c) Magermilch (je 1 ccm) sofort	×××	×××	×××	×××	××	××	||	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	Von CH = 0,56 u. f. war eine feinflockige Ausscheidung bemerkbar.
n. 24 Std.	×××	×××	×××	×××	××	××	× |	||	||	||	||	+	+	+	+	+	+	
d) Magermilch (je 1 ccm) sofort	×××	×××	×××	×××	××	××	||	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	Von CH = 0,56 u. f. war eine feinflockige Ausscheidung nach 24 Std. bemerkbar. Hier wurde $^n/_3$-Acetat u. $^n/_{30}$-Essigsäure verwendet.
n. 24 Std.	×××	×××	×××	×××	×××	××	× |	||	||	||	||	+	+	+	+	+	+	
e) Magermilch (je 1 ccm) sofort	×××	×××	×××	×××	××	×	||	||	||	||	||	—	—	—	—	—	—	Von CH = 0,56 war eine feinflockige Ausscheidung bemerkbar.
n. 24 Std.	×××	×××	×××	×××	××	××	× |	||	||	||	||	+	+	+	+	+	+	

Tabelle VIb.

	Röhrchen											Bemerkungen
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
$^n/_3$-Acetat (ccm)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	× = Stärke der Ausscheidung. | = Stärke der diffusen Trübung.
$^n/_{30}$-Essigsäure (ccm)	2 $^n/_2$	1,6 $^n/_2$	1,3 $^n/_2$	1,0 $^n/_2$	8,9	6,1	4,9	3,9	3,1	2,5	2,0	
Wasser (ccm)	7,0	7,4	7,7	8,0	0,1	2,9	4,1	5,1	5,9	6,5	7,0	
CH. 10^{-5} (ccm)	3,6	2,9	2,4	1,8	1,61	1,1	0,88	0,64	0,56	0,45	0,36	
f) Caseinlösung (je 1 ccm) sofort	××	××	×××	×××	××	||	||	||	||	—	—	0,2 g Casein werden in 100 ccm $^n/_{30}$-Natriumacetat aufgelöst.
n. 24 Std.	××	×××	×××	×××	×××	×	—	—	—	—	—	
g) Paracaseinlösung (je 1 ccm) sofort	×	××	×××	×××	××	||	||	|	—	—	—	Infolge Abwesenheit v. Kalk findet keine Paracaseinausscheidg. statt. 2 °/₀₀ Caseinlösung wurden d. Zusatz v. Lab in Paracasein umgewandelt.
n. 24 Std.	××	×××	×××	×××	×××	×××	××	××	××	—	—	

konzentration von $1{,}3 \cdot 10^{-5}$ gerinnen sollte, wie es tatsächlich der Fall ist.

Um die Gerinnungsverhältnisse der Milch durch H-Ionen näher zu untersuchen, wurde, wie das früher beschrieben worden ist, mit steigenden Mengen Acetat-Essigsäuregemisch beschickt; die Konzentrationen umfaßten hierbei eine Periode von $3{,}6 \cdot 10^{-5}$ bis $0{,}19 \cdot 10^{-5}$ Wasserstoffionen.

Über die nähere Arbeitsweise gibt die nebenstehende Tabelle (VIa) Aufschluß.

Aus den in vorstehenden Tabellen angeführten Resultaten ergibt sich das Optimum für die Ausfällung der Milch durch H-Ionen zu $1{,}3 \cdot 10^{-5}$; wenigstens ist dieses bei Vollmilch der Fall. Bei der Magermilch liegt das Optimum um etwas weniges höher; offenbar handelt es sich hier um eine Beeinflussung der Fällung durch das Fett, durch das das beginnende Fällungsoptimum etwas nach der weniger sauren Seite hin verschoben wird. Einen ähnlichen Vorgang hat Feinschmidt[1]) in ausgezeichneter Weise an Lecithin-Eiweißgemischen demonstrieren können. Bemerkt sei noch, daß nach 24 Stunden auch bei dem nächst niedrigen Röhrchen ($C_H = 1{,}25 \cdot 10^{-5}$) eine Fällung zu erkennen war.

Der Versuch f (Tabelle VIb) zeigt das Fällungsoptimum für eine Caseinlösung. Dieses Optimum liegt, wie schon Michaelis und Rona[2]) gefunden haben, bei $2{,}0 \cdot 10^{-5}$. Das nämliche Optimum zeigt auch das Paracasein.

Wenn man die beiden Werte für Caseinlösung und Milch einander gegenüberstellt, so zeigt sich ein ganz bedeutender Unterschied, der nur schwierig zu erklären ist. Vielleicht handelt es sich hierbei um eine Beeinflussung durch das Milchfett, wahrscheinlicher aber um einen Unterschied des natürlichen Milchcaseins gegenüber dem durch verschiedene Prozeduren gereinigten Präparate. Einen Einfluß des Albumins braucht man jedenfalls nicht anzunehmen, denn von Michaelis und Davidsohn (l. c.) ist kürzlich gezeigt worden, daß das native Albumin keinen Einfluß auf die Caseinfällung besitzt. Von der H-Ionenkonzentration $1{,}25 \cdot 10^{-5}$ bis zu $0{,}64 \cdot 10^{-5}$ erhält man keine

---

[1]) Feinschmidt, diese Zeitschr. 38, 244.

[2]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 28, 197.

Flockung mehr, sondern nur eine diffus getrübte Lösung, die sich durch ihre Gerinnungsfähigkeit mit Lab auszeichnet; die weiteren Abstufungen zeigen keine Opalescenz mehr und sind durch Lab nicht mehr gerinnbar. Trotzdem sind zwischen Vollmilch und Magermilch Unterschiede festzustellen; die Magermilchröhrchen lassen nach 24stündigem Stehen feine suspendierte Partikelchen erkennen, die bei der Vollmilch fehlen. Offenbar hat dieser Unterschied seine Ursache im Fett, das die feinflockigen Teilchen umhüllt und dann mitreißt.

Aus diesen Befunden können wir ersehen, daß zum Zustandekommen einer Gerinnung von Eiweißstoffen mittels Säure ein ganz bestimmtes Optimum von H-Ionen nötig ist, daß mit anderen Worten auch die Säuregerinnung eine Funktion der Wasserstoffionen ist.

Die zonenweise Veränderung der Milch unter dem Einflusse von H-Ionen steht jedenfalls mit einer physikalischen Veränderung der Eiweißstoffe in naher Beziehung. Es schien deshalb nicht aussichtslos, diese Veränderung messend zu verfolgen. Die hydrophylen Kolloide haben eine sehr geringe Oberflächenspannung; würde demnach ein Stoff zugefügt, der die Oberflächenspannung erhöhte, so müßte die Oberfläche kleiner werden, und es müßte zu einer Umwandlung des Emulsoids in ein Suspensoid, zu einer Ausscheidung kommen.

Zwei vorläufige Versuche, die mit dem Traubeschen Stalagmometer angestellt wurden, scheinen diese Annahme zu bestätigen. Mit steigender H-Ionenkonzentration fand eine Verringerung der Zahl der Tropfen statt, mithin eine Verkleinerung der Oberfläche und die Bildung eines gröberen Suspensoids.

Die diesbezüglichen Resultate sind in folgender Tabelle verzeichnet.

Tabelle VII.

	H-Konzentration — $CH.10^{-5}$								
	1,29	1,25	1,16	1,10	0,88	0,64	0,56	0,45	0,36
Zahl der Tropfen	74	75−3	75−1	75−1	76−1	76	77−2	77+2	77+1
	—	75−3	75+2	76+3	76+3	76+1	77−1	77−1	77+1

Zum Schlusse seien noch einige Versuche erwähnt, die mit der Milchgerinnung direkt nichts zu tun haben, aber die gerade für die Gewinnung gewisser Nebenprodukte bei der Käse-

bereitung von Bedeutung sind. Die physikalisch-chemischen Methoden scheinen dazu berufen zu sein, in bis dahin dunkle Vorgänge, wie sie das Vorbrechen und das Scheiden darstellen, Licht zu bringen.

Das Vorbrechen dient in der Emmentalerkäserei dazu, das beim Käseprozeß in die Molke übergegangene Fett zu gewinnen. Zu diesem Zwecke gibt der Käser zu der auf 70 bis 75° erhitzten Molke ein bestimmtes Quantum selbstbereiteter Milchsäure (Sauer) hinzu, erhitzt auf ca. 80° und schöpft nun das fetthaltige Eiweißgerinnsel (Vorbruch) ab; nachher wird nochmals Säure hinzugesetzt und zum Sieden erhitzt. Dieser Vorgang stellt das Scheiden dar. Die ausgeschiedenen Eiweißstoffe bilden dann den Zieger.

Die bei der Milchgerinnung gemachten Beobachtungen machten es nun wahrscheinlich, daß durch Versuche unter Verwendung ganz bestimmter Mengen H-Ionen ein Vorgang darzustellen war, der zu einer Aufklärung der genannten Prozesse führen konnte.

Zu diesem Zwecke wurden wie früher (aus Acetat und Essigsäure) Lösungen von bestimmter H-Ionenkonzentration bereitet und hierzu je 2 ccm Molke gegeben. Die Röhrchen wurden dann in ein ca. 85° warmes Bad gestellt. Nach einiger Zeit bemerkt man, daß sich namentlich zwei Röhrchen durch starke Fällungen von den übrigen unterscheiden. Das eine Optimum liegt bei $CH = 0{,}45 \cdot 10^{-5}$ und das andere bei $1{,}8 \cdot 10^{-5}$. Über das Nähere orientieren die nachfolgenden Versuchsprotokolle.

Tabelle VIII.

	CH.10⁻⁵										
	4,5	2,4	1,8	1,61	1,10	0,88	0,64	0,56	0,45	0,36	0,29
Versuch 1	—	—	×××	×××	××	×	×	×	××	×	×
„ 2	—	—	×××	××	××	×	×	×	××	×	×
„ 3	—	—	×××	××	×	×	×	×	××	×	×
„ 4	××× trübe	××× klar	×××	×××	××	×	×	×	××	×	×

Die × geben die Intensität der Ausscheidung an.

Nach einiger Zeit verschwinden diese scharfen Grenzen wieder, indem auch die rechts und links stehenden Röhrchen Ausscheidungen zeigen.

Das erste Optimum bei $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ entspricht der H-Ionenkonzentration, die für das Scheiden nötig ist, und das zweite bei ca. $0{,}45 \cdot 10^{-5}$ der Konzentration für das Vorbrechen.

Ähnliche Resultate wie die hier mitgeteilten sind auch mit Salzsäure und Essigsäure erhalten worden.

Über weitere Versuche, die sich an die besprochenen anschließen, soll in nächster Zeit an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Über den Durchtritt von Salzen durch das Protoplasma.

II. Mitteilung.

Über eine Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Protoplasmas auf Grund der Beeinflussung des Durchtrittes von Farbstoffen durch OH- und H-Ionen.

Von

Josef Endler.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität Prag.)

(Eingegangen am 21. Juli 1912.)

Mit 1 Figur im Text.

I. Einwirkung der Reaktion des Mediums auf die Farbstoffspeicherung.

Bei den bisher mitgeteilten Versuchen[1]) wurde nicht besonders auf die Reaktion der Außenlösung Rücksicht genommen, diese ist demnach in den einzelnen Versuchsserien als konstant anzunehmen. Im folgenden soll über die Änderungen berichtet werden, die die Farbstoffdiosmose durch den Protoplasten erfährt, wenn OH- bzw. H-Ionen zugesetzt werden. Ebenso sollen die Beziehungen erörtert werden, welche sich zwischen diesen Ionen und der Wirkung vorhandener Neutralelektrolyte äußern. Dadurch gliedert sich dieser Teil der Untersuchung in zwei Teile, deren erster die Einwirkung der Alkalinität der Lösung als solcher und deren zweiter deren Beziehung zu den Neutralsalzen behandelt.

1. Über den Einfluß von OH- und H-Ionen bei konstanter Salzkonzentration.

Es wurde ein Versuch gemacht, zu welchem steigende Konzentrationen von Natriumbicarbonat zugesetzt wurden und so die Speicherung von Methylenblau und Neutralrot in Spiro-

[1]) J. Endler, diese Zeitschr. 42, 440 bis 469.

gyra geprüft. Zur Erreichung einer konstanten Salzkonzentration waren $4 \cdot 10^{-2}$ Mol van't Hoff beigegeben. Bezüglich der Bestimmung der zugesetzten OH- und H-Ionenmenge sei eingangs gleich bemerkt, daß diese nur annähernd durch Verdünnung von Normallösungen von Säuren und Basen erreicht wurde. Eine weitergehende Bestimmung schien gegenstandslos, da die Ablesung der in der Zelle vorhandenen Farbstoffmengen infolge der subjektiven Methode keine adäquate Sicherheit gewährte. Der Versuch ergab folgendes Ergebnis.

Material Spirogyra; doppelt mit Platinkühler umdestilliertes Wasser.

Serie a) $^1/_{10000}\,^0/_0$ Methylenblau.
Serie b) $^1/_{10000}\,^0/_0$ Neutralrot.

Mol Soda	Serie a) Methylenblau		Serie b) Neutralrot	
	Kontrolle nach 12 Stunden	nach 2 Tagen	nach 12 Std.	nach 2 Tagen
0,04	Zellen wohlbehalten, mit Niederschlägen gefüllt	Sämtliche Versuche zeigen Schädigung, beste Erhaltung in 0,01 Mol Soda, Färbungsunterschiede noch gut zu erkennen.	Resultat analog der Methylenblauserie, aber Erhaltung der Zellen bedeutend schlechter.	Die Soda ist in die Zellen eingedrungen und hat die Niederschläge in gelb verfärbt, beste Erhaltung bei 0,008 norm.
0,03	Zellen wohlbehalten, Färbung schwächer			
0,02	Niederschläge nehmen kontinuierlich ab			
0,01	Bereits Zellen ohne Niederschläge . .			
0,008	Zellen mit Niederschlägen nehmen weiter an Zahl ab			
0,006	Viele ungefärbte und schwach gefärbte Zellen			
0,004	Niederschläge nur ganz schwach, Beginn der Schädigung			
0,002	Schädigung weiter fortgeschritten, Färbung nur schwach			
0	Nur in wenigen Zellen leichte Färbung			

Steigende OH-Konzentration erhöht demnach wenigstens in einem bestimmten Konzentrationsgebiet die in der Zelle gespeicherte Farbstoffmenge[1]). Sobald diese einen bestimmten Wert erreicht hat, hört die weitere Aufnahme des Farbstoffes auf und man kann sogar noch am 2. Tage die Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen deutlich erkennen. Bei annähernd neutraler Reaktion — vollständig neutrale Reaktion läßt sich ja mit den verwendeten Mitteln nicht erreichen — tritt

[1]) Siehe darüber auch Traube, diese Zeitschr. 42, Heft 6, S. 496. Die Erhöhung der Giftwirkung von Farbstoffen durch Na_2CO_3 findet durch die oben mitgeteilte Tatsache ihre Bestätigung.

nur sehr wenig Farbstoff in die Zellen ein. Zur Erhaltung des unversehrten Zustandes der Zellen ist eine bestimmte Konzentration von OH unbedingt erforderlich, sobald diese unter den vorhandenen Versuchsbedingungen unter den Wert von 0,004 Mol Natriumbicarbonat sinkt, beginnen die Zellen der verwendeten Spirogyra bereits deutliche Zeichen von Schädigung zu zeigen. Am 2. Versuchstage hatten sich die Neutralrotniederschläge in den höheren Natriumbicarbonatkonzentrationen in gelb verfärbt. Diese Verfärbung der Niederschläge wurde wiederholt auch an anderen Objekten beobachtet. Die Speicherung erfolgte am Anfange des Versuches auch dann, wenn die Lösung infolge des zugesetzten Alkali die gelbe Farbe der freien Neutralrotbase zeigte, violettrot in der Farbe des Farbstofftannats. Die Verfärbung der Niederschläge läßt sich wohl nur so deuten, daß durch das Alkali, das langsamer eintritt als das Neutralrot, schließlich der Farbstoff aus seiner Bindung an den Gerbstoff der Zelle freigemacht wird und die freiwerdende Base nicht aus der Zelle austritt, sondern höchstwahrscheinlich durch im Zellsaft vorhandene gelöste Eiweißkörper daselbst festgehalten wird. Um eine Orientierung über die Möglichkeit der Adsorption von Farbstoffen durch gelöstes Eiweiß zu erhalten, wurde folgender Versuch gemacht. In einen Dialysator wurde konzentrierte Peptonlösung eingefüllt und dieser in ein Gefäß mit Neutralrotlösung gehängt. Nach 3 Tagen zeigte die colorimetrische Vergleichung der in den Dialysator eingedrungenen Farbstoffmenge mit einem Kontrollexemplar, das kein Pepton enthielt, daß die Konzentration des Farbstoffes ungefähr die zehnfache war, wie wenn im Dialysator nur reines Wasser vorhanden gewesen wäre.

Unter gleichen Bedingungen wurde ein Versuch aufgestellt, dem als Alkali steigende Konzentrationen von NH_3 beigegeben waren. Ammoniak tritt bekanntlich bedeutend schneller in die lebende Zelle ein als fixes Alkali, wie bereits de Vries[1]) nachgewiesen hat, jedoch enthalten gleich konzentrierte Lösungen bedeutend geringere OH-Konzentrationen.

Kann man nun zwischen den beiden Versuchsserien Unterschiede feststellen, so wird man vor allem diese beiden cha-

[1]) De Vries, Sur la permeabilité du protoplasma des betteraves rouges. Arch. néerl. d. Sc. 6, 115, 1871.

rakteristischen Eigenschaften zu ihrer Erklärung heranziehen müssen.

Konzentrationen des NH_3.

0,04	0,02	0,01	0,005	0,001	0 normal

Serie a) $^1/_{10\,000}$ % Methylenblau, b) $^1/_{10\,000}$ % Neutralrot.

Serie a) Methylenblau.

1. Kontrolle nach 2 Stunden.

Über 0,005 Aggregation, von dort nur ganz geringe Färbung.

2. Kontrolle am folgenden Tag.

0,04 Aggregation, Zellen haben vielfach kollabiertes Chlorophyllband, diese sind mit blauen Niederschlägen gefüllt. Vollständig intakte Zellen sind nicht gefärbt.

0,02 Aggregation, leichte Niederschläge in den geschädigten Zellen. In den gesunden entweder keine oder nur ganz schwache. Erhaltung besser.

0,01 Aggregation wird schwächer. In gesunden Zellen sind leichte Niederschläge.

0,005 Die Aggregation nimmt weiter ab. Hier sind die meisten Niederschläge in den ungeschädigten Zellen vorhanden.

0,001 Die Färbung der Zellen tritt stark zurück. Aggregation kaum merklich. Die Erhaltung ist gut.

0,000 Zellen nicht oder kaum gefärbt.

Serie b) Neutralrot.

Ammoniak wirkt analog fördernd wie KOH. In den höheren Konzentrationen sind die Zellen gestopft voll Niederschlägen. In 0,005 und 0,001 ist auch mit Säure keine Rotfärbung zu erzielen.

Die gespeicherte Methylenblaumenge steigt demnach zwar anfangs mit der Konzentration des zugesetzten NH_3, sobald diese aber einen bestimmten Wert erreicht hat, nimmt sie wieder ab, um schließlich fast Null zu werden. Doch ist dies im untersuchten Konzentrationsgebiet für das Neutralrot nicht nachzuweisen. Für diesen Farbstoff kann nur ein Steigen der aufgenommenen Farbstoffmenge nachgewiesen werden. Ein eigentümlicher Parallelismus zeigt sich in der mit Methylenblau angestellten Serie zwischen dem Vermögen der Zellen, Farbstoff zu speichern und dem Grade der Erhaltung des Protoplasten. In den höheren Konzentrationen sind Zellen, deren Chlorophyllband völlig intakt ist, nicht gefärbt, während gerade diese bei einem Gehalte der Außenlösungen von $5 \cdot 10^{-3}$ Mol die meisten Niederschläge enthalten. Die geschädigten Zellen enthalten jedoch in $4 \cdot 10^{-2}$ Mol relativ viel Farbstoff. Es mag jedoch ausdrücklich bemerkt werden, daß auch diese Zellen zur Zeit der

Beobachtung noch am Leben waren, was das charakteristische Bild der lebend gefärbten Zelle bewies. In den Versuchen, die mit verschiedenen Salzen angestellt wurden, wurde niemals ein Zusammenhang zwischen Farbspeicherung und Schädigung einer Zelle beobachtet, vielmehr schienen diese beiden Erscheinungen völlig unabhängig voneinander zu sein.

Wie die Herabsetzung der aufgespeicherten Farbstoffmenge mit dem Steigen der NH_3-Konzentration zu erklären ist, muß vorläufig in der Schwebe bleiben. Man wird wohl auch an die Aggregation und an die dadurch bedingte Verminderung des freien Gerbstoffes denken müssen. Doch wurde an andern Objekten auch bei Gegenwart von Soda beobachtet, daß die Zellen bei höheren Konzentrationen weniger Farbstoff speichern.

Um die Bedeutung der OH- und H-Ionen auch sonst kennen zu lernen, sei folgende Versuchsreihe angeführt. Diese Versuchsreihe umfaßt das Gebiet von $^{n}/_{1000}$-HCl — $^{n}/_{10\,000}$ Mol Soda.

Verwendet wurden je 100 ccm $\frac{M}{2}$ van't Hoff mit Zusatz von $^{1}/_{2000}\,^{0}/_{0}$ Neutralrot.

Untersucht wurden folgende Konzentrationen $^{n}/_{100}$, $^{n}/_{1000}$, $^{n}/_{10\,000}$ Mol Soda, neutral, $^{n}/_{100\,000}$, $^{n}/_{10\,000}$, $^{n}/_{1000}$ HCl.

Kontrolle nach 24 Stunden 8. II. 1910.

a) Nitophyllum punctatum.

$^{1}/_{100}$ NS. Zellen sämtlich tot.

$^{1}/_{1000}$ NS. Der Thallus bietet das typische Bild, das man sonst in Meerwasser sieht. Die Zellen sind sehr intensiv in wechselnder Stärke gefärbt.

$^{1}/_{10\,000}$ NS. Die Färbung nimmt an Intensität ab.

Neutral. Die Zellen des ganzen Thallus sind ziemlich gleichmäßig, aber recht schwach gefärbt.

In den Säure enthaltenden Gefäßen zeigen einzelne noch lebende Zellen keine Färbung und sind sehr stark geschädigt.

b) Vaucheria spec., marin.

$\frac{M}{100}$ NS. Speicherung des Neutralrotes gelb, hat sehr stark gelitten, übrige Stücke verloren.

c) Ulva lactuca.

$^{1}/_{100}$ NS. Es scheinen nur einzelne Zellen gefärbt zu sein. Gibt man aber Essigsäure hinzu, so färbt sich der Thallus unter dem Mikroskop tief rot, demnach Speicherung der Base.

$^{1}/_{1000}$ NS. Ziemlich starke Färbung der meisten Zellen.

$^{1}/_{10\,000}$ NS, Neutral } Ziemlich gleichmäßige Färbung sämtlicher Zellen des Thallus, schwächer als in den vorhergehenden Versuchen.

$^1/_{100\,000}$ HCl. Schwache Färbung eines Teiles der Zellen, der größere Teil ist aber ungefärbt.

$^1/_{10\,000}$ HCl
$^1/_{1000}$ HCl } Nirgends Färbung.

d) Vidalia volubilis.

Der Gang der Färbungsintensität ist sehr gut zu erkennen.

$^1/_{100}$ NS. Die Färbung der Epidermiszellen ist sehr intensiv, dann geht die Intensität ungefähr auf die Hälfte herunter in neutral. In $^1/_{100\,000}$ HCl und $^1/_{10\,000}$ HCl wird die Färbung schwächer. In $^1/_{1000}$ HCl ist sie in den meisten Zellen verschwunden. Hier hat die Alge sehr stark gelitten, der Thallus ist ganz schlapp, während er in den übrigen Versuchen noch straff und turgescent ist.

e) Cladophora trichotoma.

$^1/_{100}$ NS. Nur in wenigen terminalen Zellen schwach gelbe Färbung, die aber erst auf Säurezusatz deutlich wird.

$^1/_{1000}$ NS. Färbung des terminalen Poles der Zellen ist sehr intensiv, während der basale Teil ungefärbt ist. Dies wiederholt sich in jeder Zelle des Thallus.

Neutral. Die Färbung erstreckt sich über die ganze Zelle, sie ist intensiver als die vorhergehende.

$^1/_{100\,000}$ HCl. Die Färbung gegenüber neutral ist noch gesteigert, keinesfalls aber herabgesetzt.

$^1/_{10\,000}$ HCl. Die noch lebenden Zellen sind intensiv rot gefärbt, die meisten unter der Erscheinung der Turgorsteigerung gestorben. Die Zellen sind terminal geplatzt und haben ihr Plasma in Form einer Kugel herausgetrieben.

$^1/_{1000}$ n-HCl. Keine lebende Zelle mehr.

Es ist demnach in der berichteten Versuchsserie nachgewiesen worden, daß auch andere Formen als die zuerst untersuchte Spirogyra sich ebenso verhalten wie diese. Ulva lactuca zeigt auch das Herabgehen der gespeicherten Farbstoffmenge bei einer höheren Konzentration von Natriumbicarbonat. Daß diesem Verhalten der Zellen eine sehr weite Verbreitung zukommen muß, scheint dadurch erwiesen; daß es aber keine allgemein gültige Regel für die Pflanzenzelle ist, zeigt das Verhalten von Cladophora trichotoma. Diese speichert bei Anwesenheit von H-Ionen die größte Farbstoffmenge auf, die sich immer mehr vermindert, wenn die Außenlösung neutral ist oder steigende Mengen von OH-Ionen enthält. Ob man daraus auf prinzipielle Unterschiede in der Durchlässigkeit der Protoplasten schließen darf, scheint von vornherein noch nicht begründet. Es müßte durch genauere Untersuchungen erst nachgewiesen werden, welche Rolle eventuelle Verschiedenheiten

der umgebenden Zellulosemembran spielen könnten. Es mag noch daran erinnert werden, daß Cladophora sich auch in den Versuchen über die Einwirkung von Neutralelektrolyten abweichend verhielt.

Zellen, die den Farbstoff in Fetttröpfchen speichern, zeigen ein gleiches Verhalten wie solche, die ihn als Tannat zurückhalten. Der folgende Versuch, der mit Rizinus- und Helianthuskeimlingen ausgeführt wurde, gibt die dafür nötigen Belege.

Untersucht wurden Rizinus- und Helianthuskeimlinge in je 10 ccm 0,01 mol. van't Hoff-Lösung, die $^{n}/_{100}$, $^{n}/_{1000}$, $^{n}/_{10000}$-KOH, neutral, $^{n}/_{10000}$-HCl, $^{n}/_{1000}$-HCl enthielt.

Die Lösungen waren aus doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

a) Methylenblau.

Die größte Farbstoffmenge wird bei der höchsten untersuchten Alkalikonzentration gespeichert. Mit Abnahme der Konzentration der OH-Ionen tritt Abklingen der Färbung ein, ohne daß sie bei Zusatz von H-Ionen ganz verschwindet. Bei Helianthus finden sich in den Epidermiszellen des Stengels Niederschläge, deren Menge sich ebenso ändert, wie die in den Fetttröpfchen der Kotyledonen gelöste Farbstoffmenge.

b) Neutralrot.

1. Ricinus.

Die Färbungsänderung ist wie bei Methylenblau. Hier verschwindet an den unverletzten Stellen der Kotyledonen in den höheren Säurekonzentrationen die Färbung vollends. In $^{n}/_{100}$ Alkali zeigt sich gleichzeitige Aufnahme von KOH, so daß in den Fetttröpfchen gelbe Speicherung der Neutralrotbase erfolgt, die bei Säurezusatz in Rot umschlägt und dadurch gut sichtbar wird.

2. Helianthus.

An der Schnittfläche der Kotyledonen haben sich die der Verwundung zunächstgelegenen Zellen intensiv gefärbt, sowohl in den Versuchen mit OH- wie mit H-Ionenzusatz. In den ersteren geht aber die Färbung tiefer in das Innere des Kotyledons. An den unverletzten Stellen verschwindet die Färbung vollends, wenn H-Ionen vorhanden sind.

Fetttröpfchen nehmen auch in vitro mehr von basischen Farbstoffen auf, wenn Alkali vorhanden ist. Es dürfte dies mit der Zurückdrängung der Dissoziation der Farbbase durch OH-Ionen zusammenhängen, da Ionen bekanntlich durch ein Lösungsmittel, das keine dissoziierende Kraft besitzt, nicht ausgeschüttelt werden können. Ebenso wird die gespeicherte Menge vermindert, wenn H-Ionen vorhanden sind. Es würde demnach diese Versuchsreihe allein nicht dafür beweisend sein,

daß die Wirkung der beiden untersuchten Ionen als eine Beeinflussung der Permeabilitätsverhältnisse des Plasmas anzusehen sei. Daß dies aber dennoch sehr wahrscheinlich ist, zeigt die Analogie zu dem Verhalten gerbstoffhaltiger Zellen, bei welchen keine derartige Änderung der Fähigkeit, den Farbstoff in der Zelle zurückzuhalten, an dem Gerbstoffe festzustellen ist.

Neutralrot wird in den höheren Alkalikonzentrationen gelb gespeichert, da dann in der Außenlösung die gelb gefärbte Farbbase vorhanden ist. Sind aber keine OH-Ionen, oder diese nur in ungenügender Menge vorhanden, so löst es sich in den Fetttröpfchen in roter Farbe, also in der Farbe des nicht dissoziierten Salzes auf. Entweder enthalten die Fetttröpfchen in der Zelle eine, wenn auch nur geringe Menge freier Fettsäuren, oder es kann sich das nicht dissoziierte Salz als solches — Ionen werden ja von fettartigen Lösungsmitteln nicht aufgenommen — in den Fetttröpfchen lösen. Versuche in vitro sprechen mehr für die erste Annahme. Einerseits ist wohl die Tatsache, daß aus Lösungen, in denen, wenn auch nur geringe, H-Ionenmengen vorhanden sind, die demnach das nicht dissoziierte Salz enthalten, von Olivenöl kaum Farbstoff aufgenommen wird, ziemlich schwerwiegend, andererseits läßt sich auch der Umstand dafür als Beweis anführen, daß aus neutralen, rotgefärbten Lösungen eines Neutralrotsalzes Olivenöl gelb speichert. Ob aber diese beiden Beobachtungen die Entscheidung zwischen den beiden sich anbietenden Erklärungen mit voller Sicherheit gestatten, ist zum mindesten zweifelhaft.

Über das Verhalten verschiedener Neutralrotsalze und saurerer Farbstoffe.

Die berichteten Versuche haben das Verhalten zweier basischen Farbstoffe gegenüber OH- und H-Ionen gezeigt. Von beiden wurde das Chlorhydrat untersucht und im wesentlichen Übereinstimmung gefunden. Doch muß sich der beobachtete Gang der Farbstoffaufnahme bei Änderung der Alkalinität der Lösung ändern, wenn statt der Chlorhydrate der benutzten Farbstoffe Salze schwacher Säuren in Verwendung kommen, oder wenn statt einer Farbbase Farbsäuren in Lösung sind.

Versuche, um die Abhängigkeit der aufgenommenen Farbstoffmenge von den Dissoziationsverhältnissen des vorhandenen

Farbsalzes festzustellen, wurden bereits von Overton und Ruhland angestellt. Speziell das Verhalten saurer Farbstoffe war Gegenstand eingehender Studien verschiedener Autoren, von denen die Untersuchungen Overtons, Ruhlands und Höbers hervorzuheben sind.

Overton[1]) stellte in bezug auf die basischen Anilinfarben fest, daß das Hydrochlorid, das Nitrat und das Sulfat des Rosanilins ungefähr gleich rasch in Zellen gespeichert werden. Derselbe Autor[2]) hat auch auf die Tatsache hingewiesen, daß die Verwendung verschiedener Chininsalze in therapeutischer Hinsicht keine Unterschiede bedinge. Dadurch schien nachgewiesen, daß die Dissoziationsverhältnisse des Farbstoffes keine Rolle bei der Aufnahme des Farbstoffes spielen. Ebenso beobachtete auch Ruhland[3]) zwischen der Base, dem Chlorhydrat und dem Acetat des Neutralrots keine Unterschiede, doch spricht er von öfter auftretenden kleinen Unregelmäßigkeiten zwischen den einzelnen Salzen. Er prüfte das Verhalten dieser Farbstoffe in $Ca(HCO_3)_2$-haltigem, dann in reinem destillierten Wasser und in solchem, dem 10^{-6} n-HCl zugefügt war. Doch konnte er Unterschiede feststellen, wenn die einzelnen Salze in der Membran verschieden stark gespeichert wurden. Daß das gerbsaure Toluylenrot nur sehr langsam gegenüber den übrigen Verbindungen in die Zelle tritt, ist nach dem über diese Verbindung bereits Gesagten[4]) verständlich. Die vorliegende Untersuchung hat in bezug auf die übrigen Neutralrotsalze abweichende Ergebnisse geliefert. Es wurden das Chlorhydrat, das Acetat und das Carbonat des Neutralrots untersucht, indem zu ihren Lösungen steigende Mengen von Alkali hinzugefügt wurden.

Die Salze wurden hergestellt, indem die Neutralrotbase mit Alkali gefällt und auf dem Filter unter großen Verlusten mit viel Wasser ausgewaschen wurde, dann wurde der Niederschlag zur Herstellung des Acetats mit schwacher Essigsäure vom Filter gewaschen und vorsichtig eingedampft. Zur Herstellung des Carbonats wurde in Wasser, das

---

[1]) Overton, Jahrb. f. wiss. Botan. 34, 66, 1900.

[2]) Overton, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 189, 1897; auch Festschrift d. Züricher naturforsch. Ges. 1896.

[3]) Ruhland, Jahrb. f. wiss. Botan. 46, 1, 1909.

[4]) J. Endler, diese Zeitschr. 42, 440.

Neutralrotbase suspendiert enthielt, Kohlensäure so lange eingeleitet, bis der Niederschlag größtenteils gelöst war, dann abfiltriert und die überschüssige Kohlensäure durch Kochen ausgetrieben. Die Einstellung der Lösungen erfolgte auf gleichen Farbenton mit Neutralrotchlorhydrat.

Der folgende Versuch wurde mit 0,02 mol. van 't Hoff gemacht, die steigende Konzentrationen von NH_3 enthielt. Die Konzentration des Neutralrotchlorhydrats betrug $^1/_{2000}$ %. Das verwendete Wasser war doppelt destilliert.

NH_3	Chlorhydrat	Carbonat	Acetat
0,04 n	Die Zellen sind geschädigt, nur wenige gesund, aber schwach gefärbt	Die Färbung ist bedeutend stärker, doch sind durchaus nicht alle Zellen gefärbt, sondern auch solche ohne Niederschläge vorhanden	Niederschläge und Erhaltung intermediär zwischen Chlorhydrat und Carbonat
0,02	Erhaltung bedeutend besser, Färbung steigt	Alle Zellen sind mit Farbstoff vollgepfropft	Färbung besser als Chlorhydrat und weniger als Carbonat
0,01	Färbung wird intensiver	Hier ist gegenüber 0,05 ein Abfallen zu bemerken, das jedoch nicht sehr stark ist	Die Zellen sind wie im Carbonat, nur etwas schwächer gefärbt
0,005	Die Färbung vermindert sich sehr stark, in vielen Zellen sind nur mehr leichte Niederschläge zu bemerken	Auch hier geht die Färbung zurück, jedoch werden die Zellen bei ausgezeichneter Erhaltung immer noch recht reichlich gefärbt	Niederschläge sind schwächer als im Carbonat, aber immerhin noch reichlicher als im Chlorhydrat
0,001	Die Färbung ist fast verschwunden, nur in wenigen Zellen sind Niederschläge vorhanden	Hier gilt dasselbe wie für 0,005. Ein leichtes Zurückgehen ist zwar festzustellen, aber immerhin sind noch reichlich gefärbte Zellen vorhanden	Die Farbstoffaufnahme wie beim Carbonat, aber etwas schwächer
0	Die Färbung ist bis auf geringe Spuren verschwunden	Die Färbung ist noch in ziemlicher Intensität erhalten	Die Färbung ist größtenteils verschwunden

Die Ergebnisse des ersten Versuches sind, um ein annäherndes Bild davon zu geben, in der nebenstehenden Kurve eingetragen. Die Ordinaten, die die jeweilig in der Zelle gespeicherten Farbstoffmengen andeuten, sind nur schätzungsweise

angegeben, doch ist die Kurve (Fig. 1) für die rasche Orientierung vorteilhaft.

Eine zweite Versuchsserie mit Natriumbicarbonat ergab analoge Resultate.

Die Grenzkonzentration, bei der noch Speicherung sichtbar war, betrug für das

Chlorhydrat	0,04	mol.
Acetat	0,02	mol.
Carbonat	0,01	mol.

Doch konnte nach dem Zusatze von Essigsäure an der Rotfärbung der Zellen erkannt werden, daß auch im Carbonat und Acetat in höheren Konzentrationen eine schwache Speicherung der Base eingetreten war.

Bei 0,005 mol. ist in allen drei Salzen ein Ansteigen an Färbung zu beobachten.

0,001 mol. Chlorhydratfärbung ist hier am stärksten.

Acetat: Die Zellen zeigen sehr zahlreiche Niederschläge.

Carbonat: Zellen gestopft voll Niederschläge, sie sind die am stärksten gefärbten der ganzen Versuchsserie.

0,00 mol.: In allen drei Versuchen sind Zellen gefärbt.

Carbonat $>$ Acetat $>$ Chlorhydrat: Diese Reihenfolge gibt die Ordnung nach Zahl und Intensität der gefärbten Zellen an.

Da die beiden Versuchsserien im wesentlichen übereinstimmen, mögen die bestehenden Verhältnisse an den Kurven, die den ersten Versuch wiedergeben, erläutert werden.

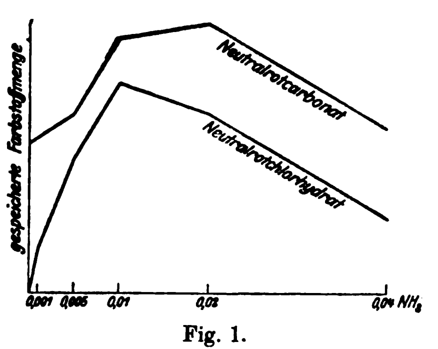


Fig. 1.

Während alle drei Salze bei neutraler Reaktion nur in geringfügiger Menge in der Zelle gespeichert werden — das Carbonat tritt allerdings bereits da etwas stärker ein — zeigen sich sofort Unterschiede, sobald kleine Mengen Alkali zugesetzt werden. Die aus einer Neutralrotcarbonatlösung gespeicherte Farbstoffmenge steigt sehr rasch mit zunehmendem Alkali an, um dann, wenn in 0,02 der höchste Stand erreicht ist, wieder etwas abzufallen. Das Chlorhydrat dagegen zeigt einen langsamen Anstieg der Färbungskurve, es wird selbst bei maximaler Speicherung nicht soviel Farbstoff aufgenommen, wie im Car-

bonat. Die Kurve des Acetats verläuft zwischen den beiden anderen Kurven in der Mitte. Diese Ergebnisse weichen von den Overtonschen und Ruhlandschen Versuchen scheinbar ab. Doch möchte ich diese Abweichung nur als eine scheinbare bezeichnen, denn wenn man durch die das Verhalten der einzelnen Salze kennzeichnenden Kurven Linien legt, die auf die Abszissenachse senkrecht sind, so zeigt es sich, daß man Stellen finden kann, in denen die Schnittpunkte dieser Senkrechten mit den Kurven nicht weit auseinanderliegen. Beobachtet man nun gerade bei diesen Alkalikonzentrationen, so ist es leicht ersichtlich, daß da kleinere Unterschiede nur schwer sichtbar werden können. Ruhland hat Versuche bei verschiedenen Alkalikonzentrationen angestellt, und zwar wählte er einerseits reines Wasser, andererseits solches, dem $CaCO_3$ zugesetzt war, und solches mit 10^{-6} n-HCl. Bei neutraler Reaktion sind tatsächlich die Unterschiede zwischen den aus den drei Farbsalzen gespeicherten Farbstoffmengen nicht bedeutend, und diese verschwinden, wenn nur eine geringe Menge von H-Ionen zugeführt sind, da ja diese die gespeicherte Farbstoffmenge auf ein Minimum herunterdrücken oder die Farbstoffaufnahme sogar völlig verhindern. Auch bei den untersuchten OH-Ionenkonzentrationen ist es immerhin möglich, daß gerade eine solche gewählt wurde, die in der Nähe des Maximums für die drei Salze lag, und auch dann lassen sich vorhandene Differenzen nur schwer erkennen. Bei der Untersuchung steigender OH-Ionenkonzentrationen müssen sie aber zur Beobachtung gelangen. Es fragt sich nun, wie diese Beobachtungen aufzufassen sind. Die Salze des Neutralrots mit starken Säuren sind weitgehend hydrolysiert und es sind neben den Ionen und nicht dissozierten Molekeln des Farbstoffes freie Salzsäure und demnach eine kleine Menge von H-Ionen vorhanden. Dies ist, wenn auch bedeutend schwächer, beim Neutralrotacetat der Fall. Nun ist aber bereits nachgewiesen, worden, und es soll in seiner Beziehung zur Mechanik des Farbstoffdurchtrittes auch die Plasmahaut noch erörtert werden, daß freie H-Ionen die in der Zelle aufgespeicherte Menge des Farbstoffes ganz bedeutend vermindern bzw. sogar die Farbstoffaufnahme völlig hemmen können. Wenn man nun annimmt, daß vor allem diese H-Ionen die Ursache des lang-

samen Ansteigens der aus Neutralrotchlorhydrat gespeicherten Farbstoffmenge bei steigender Alkalikonzentration gegenüber dem raschen Emporklimmen der dem Neutralrotcarbonat entsprechenden Kurve sind, so ist damit wohl für diese Abweichungen eine plausible Deutung gegeben. Doch möchte ich die entwickelte Vorstellung nur als eine allgemeine Überlegung betrachtet wissen, die derzeit noch nicht auf die Analyse der beobachteten Details einzugehen vermag. Dies könnte nur auf Grund besonderer Versuche geschehen, die sich wohl auch einer Methode bedienen müßten, die genauer ablesbare Resultate zu geben imstande wäre.

Bedeutend einfacher liegen die Tatsachen, wenn man die Aufnahme negativ geladener Farbstoffe mit positiven Farbstoffen vergleicht, deren Eindringen bisher in der vorliegenden Untersuchung geprüft wurde.

Allerdings ist hier ein Umstand zu beachten, der wohl das erhaltene Bild einigermaßen trübt, nämlich der, daß die lebende Zelle nur ausnahmsweise, eigentlich fast nie Stoffe enthält, die diese Farbstoffe zurückhalten könnten. Diese Tatsache scheint für die Mechanik der Zelle als kolloides System einigermaßen charakteristisch zu sein. Selbst die Alkaloide, die, wenn man sie in vitro mit Salzlösungen fällt, reichlich saure Farbstoffe mitreißen, sind in der Zelle nicht imstande, saure Farbstoffe zu speichern, wie darauf gerichtete Versuche mit einer Anzahl Solanaceen dargetan haben. Nur diejenigen sauren Farbstoffe, die sich leicht in Fetttröpfchen lösen, können leicht durch Verteilung zwischen den im Plasma suspendierten Fetttröpfchen und dem Wasser der Außenlösung in einigermaßen beträchtlicher Menge in der Zelle zurückgehalten werden. Man könnte auch das Abnehmen der photodynamischen Wirkung bei Alkalizusatz und das Ansteigen bei Vorhandensein von H-Ionen bei sauren Farbstoffen indirekt für eine Beurteilung der in die Zelle eingedrungenen Farbstoffmenge auszunützen versuchen, doch daß gerade diese Schlußart recht angreifbar ist, bedarf wohl keiner weiteren Erörterung. Geradezu ein Schulbeispiel und ungemein charakteristisch für die Bedeutung der Umladung des Farbions ist das Fuchsinion. Neutrales Fuchsin, Anilinfuchsin und andere Handelsprodukte, deren Kation im wesentlichen das Triphenylrosanilin ist, dringen

leicht und rasch in die lebende Zelle ein. Wird jedoch am Farbstoffrest eine Sulfosäuregruppe addiert, so wird er umgeladen und das Fuchsinanion kann nur ausnahmsweise in lebenden Zellen aufgenommen werden. Höber[1]) und Ruhland[2]) haben eine große Anzahl verschiedener Säurefarbstoffe daraufhin untersucht, und knapp vor der letzten Redaktion der vorliegenden Abhandlung erschien eine Abhandlung von Küster[3]), die sich mit demselben Gegenstande befaßt. Höber machte für das Nichteindringen der Säurefarbstoffe vor allem den negativen Ladungscharakter des Farbions verantwortlich, hebt aber dabei besonders noch den entweder echten oder kolloidalen Charakter der Lösung als einen wesentlich mitbestimmenden Faktor hervor. Die vorhandene Kombination dieser beiden Determinanten läßt bereits Schlüsse auf die Aufnehmbarkeit irgend eines beliebigen Farbstoffes zu. Sind Säurefarbstoffe hochkolloidal, so können sie nicht in die lebende Zelle aufgenommen werden. Je mehr der Dispersitätsgrad eines Farbstoffes sinkt, desto mehr werden die Erscheinungen der negativen Adsorption an Bedeutung gewinnen, so daß im idealen Grenzfall keinerlei Durchtritt durch die Membran erfolgen kann.

Ist aber ein Stoff in der Zelle, der, wenn auch nur in geringem Maße, den Farbstoff speichert, so können starke Färbungen mit der Zeit erreicht werden, wenn in der Zeiteinheit auch nur äußerst geringe Mengen Farbstoff den Protoplasten passieren können. Um daher die Abhängigkeit der Säurefarbstoffe von der OH- und H-Ionenkonzentration studieren zu können, wurde das fettlösliche indigsulfosaure Natron gewählt, das in Fetttröpfchen ziemlich reichlich gespeichert werden kann.

Zu diesem Versuche wurden verwendet

a) Ricinussamen,

b) Kotyledonen von Helianthuskeimlingen,

c) Lupinensamen (ausdauernde L. von Bahlsen-Prag).

---

[1]) Höber, diese Zeitschr. **20**, 256. — Höber und Chassin, Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Koll. **3**, H. 2, 1908.

[2]) Ruhland, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **28**, 1910.

[3]) P. Küster, Jahrb. f. wiss. Botan. **50**, 3. H., 260.

Die Samen wurden in 500 ccm 0,05 mol. van't Hoff mit Zusatz von

1. 0,001 HCl 2. neutral 3. 0,001 Kalilauge	untersucht. Die Konzentration des indigsulfosauren Na war $^1/_{10}$ %.

Kontrolle nach 24 Stunden.

a) Ricinussamen zeigen bei neutraler und alkalischer Reaktion schwachblaue Färbung, bei alkalischer eher etwas schwächer als bei neutraler. In der angesäuerten Lösung dagegen liegen tiefblaue Samen. Bei der mikroskopischen Kontrolle zeigt es sich, daß die Färbung nur wenige Zellschichten tief in das Innere des Kotyledons hineinreicht. Das Färbungsbild ist je nach der Lage der Zellen verschieden. In den obersten Zellen sind intensiv gefärbte Öltropfen vorhanden, während in tieferen Zellschichten das Aleuron blau gefärbt ist. Hin und wieder mag man auch die Globoide etwas stärker gefärbt im Aleuron erkennen.

b) Helianthuskeimlinge zeigen gefärbte Fetttropfen, im übrigen dasselbe Bild wie Ricinus. Die Fetttröpfchen der in saurer Lösung liegenden Kotyledonen sind bedeutend intensiver gefärbt als die in neutraler, diese wieder stärker als die in basischer Lösung.

c) Lupinus zeigt ähnliches Verhalten wie die beiden vorigen.

H-Ionen vermehren demnach die in der Zelle gespeicherte Menge eines Farbanions. Diese Feststellung ist von einer gewissen Bedeutung, da sie beweist, daß auch die Hemmung der Aufnahme der Farbstoffkationen nicht einfach schlechthin als eine Permeabilitätsherabsetzung der Plasmahaut durch Koagulation zu deuten sei, da gerade die Säurefarbstoffe das Protoplasma leicht passieren, wo Farbstoffkationen nicht gespeichert werden können. Es ist damit der Beweis geliefert, daß die Farbstoffdiosmose wesentlich in noch näher zu erörternder Weise von den Aufladungskonstanten des Plasmas abhängt.

Außerdem wurden von einer Reihe anderer Säurefarbstoffe neben den käuflichen Alkalisalzen auch die Ammoniumsalze untersucht.

Es waren dies:

Fuchsin S	Kongorot	Orcein	Phloxin
Echtgrün	Nigrosin	Anilinorange	Eosin

Die Ammoniumsalze waren hergestellt durch Fällung der Farbsäure mit verdünnter Säure, Auswaschen des Niederschlages

am Filter und Auflösen in schwachem Ammoniak und schließlich durch vorsichtiges Abdampfen. Sie sind bedeutend weniger löslich als die entsprechenden Alkalisalze. Es wurde weder bei diesen noch bei jenen ein Eindringen in die Zelle beobachtet, wenn man von Kern- und Plasmafärbungen absieht, die gelegentlich bei noch erhaltener Plasmolysierbarkeit beobachtet wurden, denen aber, da sie als ein Zeichen des Absterbens der Zelle zu betrachten sind, keinerlei theoretische Bedeutung für die lebende Zelle beizumessen ist.

Was die beiden fluorescierenden Farbstoffe Phloxin und Eosin betrifft, so war ihre Schädlichkeit als Ammoniumsalz entsprechend der Herabsetzung der Fluorescenz und der photodynamischen Wirkung vermindert. Die photodynamische Wirkung nimmt, wie bereits durch Jodelbauer[1]) festgestellt wurde, in alkalischer Lösung ab und wird in saurer bedeutend gesteigert. Ob man aber daraus Schlüsse auf das Eindringen dieser Farbstoffe in die Zelle ziehen kann, erscheint fraglich.

Die Abhängigkeit der Farbstoffdiosmose von der Alkalinität der Lösung zeigen die Amphoterelektrolyten unter den Farbstoffen in besonderer Weise. Da diese je nach dem, ob OH- oder H-Ionen in der Lösung vorhanden sind, entweder als Kation oder als Anion reagieren können, kann man ebenso durch Steigerung der OH- wie der H-Ionenkonzentration eine Vermehrung der gespeicherten Farbstoffmenge erwarten. Geprüft wurden Alkanna und Sudan III. Als Material wurde Ricinussamen, sowohl gekeimt wie ungekeimt, benutzt. Alkanna wird nach dem Umschlagen in blau auch blau gespeichert. In den Ricinussamen ist die Färbung an ganz kleine Tröpfchen gebunden, die beim Präparieren eines Schnittes im Wasser rasch zusammenfließen. Übereinstimmend wurde in die Zellen eine größere Farbstoffmenge aufgenommen, wenn OH- wie wenn H-Ionen zugesetzt werden.

2. Über die Beeinflussung der Wirkung der OH- und H-Ionen durch Salze.

Nähere Resultate über die Bedeutung der OH- bzw. H-Ionen für das Durchtreten von Farbstoffen durch das Proto-

[1]) Jodelbauer, diese Zeitschr. 3, 482, 1907; 8, 61, 1908.

plasma erhält man, wenn man die Beeinflussung des Farbstoffaustrittes aus der Zelle beobachtet. Da es jedoch vorteilhaft erscheint, dies zugleich mit den Beziehungen abzuhandeln, die sich zwischen der Wirkung der Salze auf die Farbstoffdiffusion und gleichzeitig anwesenden OH- bzw. H-Ionen ergeben, so sollen zuerst diese besprochen werden, was darüber bei Versuchen festgestellt wurde, die den Vorgang der Speicherung in der Zelle betrafen.

Fügt man nur ganz geringe Mengen von OH-Ionen zu der Außenlösung hinzu, so kann man den gleichen Gang der Salzeinwirkung beobachten, wie er auch ohne Alkali festgestellt wurde. Die Salzkonzentration, die vorhanden sein muß, damit größtmögliche Farbstoffmengen gespeichert werden, ist dieselbe geblieben, bzw. ihre Änderung ist so gering, daß es nicht möglich ist, sie nachzuweisen. Doch ist bereits deutlich festzustellen, daß der hemmende Einfluß höherer Salzkonzentrationen durch Zufügung von OH-Ionen wenigstens teilweise aufgehoben werden kann. Dabei sind die in den Zellen gespeicherten Farbstoffmengen deutlich größer als im neutralen Versuch.

Um diese Tatsachen zu belegen, sei das folgende Protokoll angeführt.

Es wurden verschiedene See- und Süßwasserformen in van't Hoffscher Lösung, die von 0 mol. in 10 Stufen zu je 0,1 mol. abgestuft war, untersucht. Als Farbstoff war Neutralrot vorhanden.

Die Serie a war aus in Platinkühler umdestilliertem Wasser hergestellt, zu der Serie b wurde noch $^{n}/_{10\,000}$-Soda zugefügt. Die Temperatur schwankte von 15 bis 20°.

Kontrolle am 4. Tag.

1. Vallisneria und Elodea.

Maximum der Färbung liegt bei 0,1. In der alkalisierten Serie ist die Färbung nur weniger stärker, dagegen ist die Erhaltung der alkalisierten Serie bedeutend besser. Die Chlorophyllkörner in dieser sind noch frisch grün, während sie in Serie a verfärbt sind.

2. Ulva lactuca.

Der Unterschied zwischen Serie a und b tritt nicht so stark im Erhaltungszustand hervor, dagegen ist die intensivere Färbung sehr deutlich, wenn Alkali zugegen ist.

	Serie a neutral	Serie b n/10 000-Natriumbicarbonat
0,5 mol.	Die Zahl und Intensität der gefärbten Zellen ist deutlich geringer als mit Alkali	Die meisten Zellen sind intensiv gefärbt
0,6 mol.	Abnahme der Färbung	Die Zahl der gefärbten Zellen nimmt ab, sie ist ungefähr gleich wie in 0,5 mol. bei neutraler Reaktion
0,7 mol.	Nur wenige Zellen und diese nur schwach gefärbt	Die Färbung nimmt weiter ab, ist aber noch reichlich vorhanden
0,8 mol.	Nur selten gefärbte Zellen, abgesehen von den Wundrändern	Viele intensiv gefärbte Zellen über den Thallus verstreut, daneben andere, die wenig oder gar nicht gefärbt sind
0,9 mol.	Nirgends ist Färbung eingetreten	Die gefärbten Zellen sind immer noch ziemlich zahlreich.

3. Nitophyllum punctatum

hat in beiden Versuchsreihen stark gelitten. Phykoerythrinkrystalle sind ausgefallen und nur wenige Partien des Thallus sind intakt, im neutralen Versuch aber weniger als im alkalisierten. Für genaue Färbungsvergleichung sind diese aber nicht ausreichend.

4. Vaucheria spec. marin.

hat in beiden Serien stark gelitten.

5. Vidalia volubilis.

Die beobachteten Verhältnisse entsprechen ungefähr denen bei Ulva.

Versuche an Spirogyra mögen dartun, wie sich die Zelle verhält, wenn man die Alkalikonzentration in einem größeren Konzentrationsgebiet ändert. Es wurde das Verhalten von KOH und Ammoniak vergleichend untersucht. Zu diesem Versuche wurde Spirogyra in van't Hoffscher Lösung mit Zusatz von $^1/_{2000}$ % Methylenblau gebraucht. Als Alkali diente KOH.

	0,04 mol. van't Hoff	0,02 mol.	0,01 mol.	0,005 mol.	0,001 mol.	0
0,005 n-KOH	Ein Teil d. Zellen enthält leichte Niederschläge, der andere Teil ist leer. Die Erhaltung ist hier am besten in dieser Salzkonzentration.	Die stärkste Färbung bei dieser Alkalikonzentration, alle Zellen sind voll Niederschläge.	Die Zellen sind noch stark gefärbt, aber weniger intensiv als in 0,02.	Die gespeicherte Farbstoffmenge nimmt immer mehr ab.	Fast keine Färbung mehr.	In den Zellen fast kein Farbstoff aufgenommen

	0,04 mol. van't Hoff	0,02 mol.	0,01 mol.	0,005 mol.	0,001 mol.	0
0,001 n-KOH	Auch hier ist in einigen Zellen etwas Färbung, aber bedeutend weniger, andere sind leer.	Ungefähr gleich dem rechts danebenstehenden Versuch.	Stärker gefärbt als in 0,2 mol. van't Hoff. Das Maximum liegt entweder hier oder zwisch. den beiden Konzentrationen.	Die Färbung ist hier bedeutend schwächer als in 0,01 mol. van't Hoff.	Die Färbung geht zurück, ist aber stärker als bei der Alkalikonzentration 0,005 normal.	In den Zellen fast kein Farbstoff aufgenommen
0,0001 n-KOH	Fast keine Färbung.	Die Färbung ist sehr gering, sie ist bedeutend schwächer als bei höherem KOH-Gehalt.	Die Färbung nimmt etwas zu, bleibt aber an Stärke gegenüb. den übrigen OH-Konzentrationen zurück.	Maximum der Färbung, die Zellen sind sehr stark gefärbt.	Die Färbung nimmt bedeutend ab.	

Ein Versuch mit NH_3 gibt analoge Resultate. Material und Versuchsbedingungen sind dieselben wie im vorigen Versuch.

An Farbstoff war $^1/_{2000}$ % Neutralrot vorhanden.

1. Kontrolle nach 2 Stunden.

Überall ist Ansteigen der Färbung mit Ansteigen der NH_3-Konzentration zu bemerken, doch sind die gespeicherten Farbstoffmengen noch zu gering, um sicher verglichen zu werden.

2. Kontrolle nach 12 Stunden.

NH_3	0,04 mol. van't Hoff	0,01 mol.	0,005 mol. van't Hoff
0	Leichte, diffuse Färbung der Zellen. Die Erhaltung ist nur teilweise gut.	Die Färbung ist etwas stärker, schwache Niederschläge, sonst gleich.	Wie in 0,01 mol. van't Hoff.
0,001	Die Färbung wird intensiver. Die Niederschläge vermehren sich, die Erhaltung ist jedoch nicht besser.	Die Erhaltung ist bedeutend besser als ohne NH_3. Die Zellen sind mit dunkelroten Niederschlägen gefüllt, nur wenige geschädigt.	Wie in 0,01 mol. van't Hoff.
0,005	Die Färbung steigt an, ohne aber die Intensität wie in 0,01 mol. van't Hoff zu erreichen. Die Erhaltung ist nicht besser.	Niederschläge erfüllen dicht die Zelle. Sie sind feinkörnig blaurötlich gefärbt, manche Zellen sind geschädigt, sonst ist die Erhaltung gut.	Die meisten Zellen enthalten ganz schwache Niederschläge, sind dabei geschädigt, wenn auch lebend.

NH_3	0,04 mol. van't Hoff	0,01 mol.	0,005 mol. van't Hoff
0,01	Die meisten Zellen sind gut erhalten und enthalten reichliche Niederschläge.	Die Färbung läßt hier bereits bedeutend nach.	Ungefähr wie in 0,01 mol. van't Hoff.
0,02	Die Färbung nimmt immer mehr zu. Die Zellen sind gut erhalten, nur hin und wieder ist eine geschädigte Zelle.	Die Färbung nimmt kontinuierlich ab.	Ungefähr wie in 0,01 mol. van't Hoff.
0,04	Hier ist die stärkste Färbung, doch bleibt sie in ihrer Intensität stark hinter der bei 0,01 mol. van't Hoff erreichten maximalen Färbung zurück.	Der größte Teil der Zellen ist geschädigt, zeigt schwache Niederschläge.	

van't Hoff mol.	Normalität des Alkalis		1000 K	
	KOH	NH_3	KOH	NH_3
0,001	—	—	—	—
0,005	0,0001	0,001	0,0234	0,028
0,01	0,001	0,005	0,234	0,096
0,02	0,005	—	1,150	—
0,04	—	0,04	—	0,184

Um über diese beiden Versuchsreihen eine raschere Übersicht zu bekommen, wurden die Werte jener Konzentrationen von NH_3 und KOH, die in der Lösung vorhanden sein müssen, damit bei einer gegebenen Konzentration der van't Hoffschen Lösung die maximale Speicherung des Farbstoffes in der Zelle erreicht werden konnte, in der obenstehenden Tabelle zusammengestellt. Allerdings dürfen die erhaltenen Werte nur unter den Kautelen, die durch die Art ihrer Ablesung gegeben sind, ausgewertet werden. Allgemein ergibt sich, daß um so mehr Alkali zugesetzt werden muß, je mehr Neutralsalz vorhanden ist, damit die größtmögliche Farbstoffmenge in die Zelle aufgenommen werden kann. Diese Beziehung gilt nicht nur für die Aufnahme des Farbstoffes, auch für die Erhaltung des unversehrten Zustandes der Zellen ist es ungemein wichtig, daß eine bestimmte quantitative Beziehung zwischen der Konzentration der OH-Ionen und dem Gehalt der Lösung an Neu-

tralelektrolyten eingehalten wird. Auch hier entsprechen höheren Salzkonzentrationen höhere Konzentrationen des notwendigen Alkali, doch möge bemerkt sein, daß optimale Erhaltung der Zellen nicht eo ipso auch mit optimaler Farbspeicherung zusammenfällt. Auch die Hemmung der Farbstoffaufnahme durch gewisse höhere Konzentrationen von Neutralsalzen wird durch OH-Ionen aufgehoben.

Bezüglich der Wirkung der einzelnen Alkalien geben die der Tabelle beigefügten Angaben über die Leitfähigkeit der verwendeten Konzentrationen Aufschluß. Es sind in der Tabelle die 1000fachen Werte für K, das ist die Leitfähigkeit in cm Ohm der verwendeten Alkalien angeführt, die Anhaltspunkte über die Dissoziation dieser Lösungen geben, da die elektrolytische Beweglichkeit des K^+ und NH_4^+ kaum verschieden ist. Danach ist der OH-Ionengehalt für die niederen Konzentrationen der ausschlaggebende Faktor. Bei einem Gehalt der Lösung von 0,005 mol. van't Hoff müssen 0,0001 mol. KOH bzw. 0,001 mol. NH_3 vorhanden sein. Die dafür ermittelten Werte von 1000 K stimmen genügend überein, 0,0234 für KOH und 0,028 für NH_3. Sobald aber die Konzentration der zugesetzten Alkalien diesen Wert überschreitet, so scheint es, als ob Spezialwirkungen ihrer Kationen, des K^+ einerseits und des NH_4^+ andererseits hervortreten würden. Die OH-Ionenkonzentration der KOH-Lösungen muß einen bedeutend höheren Wert erreichen, als jene der NH_3-haltigen, damit gleiche Mengen des Farbstoffes bei gegebenem Salzgehalt gespeichert werden können. Das Ammoniak wirkt demnach bedeutend stärker, als man nach der Konzentration seiner OH-Ionen erwarten könnte. Wenn man allerdings die Normalität der Lösungen vergleicht, so liegen die Konzentrationswerte des NH_3 bedeutend höher, da eine NH_3-Lösung nur relativ kleine OH-Mengen enthält. Eine Erklärung dieser Tatsachen läßt sich wohl derzeit noch nicht geben, da das Gebiet der Wirkungen verschiedener Basen noch nicht genügend studiert ist, um klare Vorstellungen zu ermöglichen.

Beobachtet man den Austritt des Farbstoffes aus der Zelle, so bewirkt Zusatz steigender OH-Ionenmengen, daß die austretende Farbstoffmenge um so größer ist, je größer der Gehalt der Außenlösung an diesen Ionen ist. Die anbei ein-

geschobene Tabelle soll dies dartun. Diese gibt wieder, wie der Einfluß eines Neutralelektrolyten auf die Exosmose eines Farbstoffes durch Zusatz von Alkali modifiziert wird. Es war bereits für verschiedene Salze festgestellt worden, daß die austretende Farbstoffmenge im allgemeinen durch Neutralelektrolyte gesteigert wird. Fügt man nun Alkali zu der Salzlösung hinzu, so ergibt sich aus der Tabelle, daß sich die fördernde

1. Kontrolle nach 15 Stunden. Lebend. 2. Kontrolle nach 48 Stunden.

N-Soda	0	0,012	0,01	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	NaCl	0	0,012	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
0	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖		‖	‖	·	‖	—‖	‖	‖	—
0,00015	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖		‖	‖	‖	‖	—‖	‖	‖	—
0,00031	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖		‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	—
0,00062	‖	‖	‖	‖	‖	—‖	‖	—		‖	‖	‖	‖	‖	—	—	—
0,00125	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	—‖		‖	‖	—‖	—	—‖	—‖	—	—
0,0025	‖	‖	‖	‖	—‖	—‖	—	—		·	‖	‖	‖	—	—	—	—
0,005	‖	‖	·	—	—	‖	—	—		‖	—	—	—	—	—	—	—
0,01	‖	‖	‖	‖	—	—	—	—		‖	—	—	—	—	—	—	—
								Tot[1]).									
0	‖	‖	‖	‖	‖	‖	—‖	—		‖ Plf.	‖	‖—	‖—	—‖	‖—	—	—
0,00015	‖	‖	‖	‖	‖	‖	‖	—‖		‖ Plf.	‖ Plf.	‖ Plf.	‖ Plf.	‖	‖—	—	—
0,00031	‖	‖	‖	—‖	—‖	—‖	—‖	‖		‖	‖—	—	‖—	—	—	—	—
0,00062	‖	—‖	—‖	—‖	—‖	—‖	—	—		‖—	—	—	—	—	—	—	—
0,00125	·	·	·	·	·	·	·	·		·	·	·	·	·	·	·	·
0,0025	·	‖	‖	·	‖	—	—	—		·	—	—	—	‖	—	—	—
0,005	‖	‖	‖	‖	‖	—	—	—		‖—	—	—	—	—	—	—	—
0,01	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—	—

Exosmose von Neutralrot bei gleichzeitiger Änderung der vorhandenen Salz- und Alkalikonzentration aus Elodea.

Salz: NaCl. Alkali: Natriumbicarbonat.

Plf. bedeutet: Es ist Plasmafärbung stark eingetreten.

‖ „ : Es sind Niederschläge vorhanden.

— „ : Die Zellen sind leer.

Auf die einzelnen Stadien an Auflösung wurde keine Rücksicht genommen.

---

[1]) Die Tötung fand durch heißen Wasserdampf statt; siehe J. Endler, diese Zeitschrift 42, 440.

Wirkung der OH-Ionen und des Neutralsalzes summieren. Man wird nicht fehlgehen, wenn man die beschleunigende Wirkung des Alkalis auf die Exosmose des Farbstoffes mit der Beeinflussung des Eintrittes vergleicht, der ja wenigstens in einem bestimmten Konzentrationsgebiet durch OH-Ionen auch bedeutend beschleunigt werden kann. Ebenso ergibt sich eine Parallele zwischen der Tatsache, daß durch geringeren Salzzusatz die in den Zellen gespeicherte Farbstoffmenge vermehrt werden kann und der Erhöhung der ausgetretenen Farbstoffmenge durch Neutralelektrolyte. In beiden Fällen nehmen die durch das Plasma tretenden Farbstoffmengen zu. Will man den Vergleich weiterführen, so kann man in der Hemmung des Farbaustrittes, wie sie durch Al-Salze und Na-Tartrat bzw. Citrat hervorgebracht wird, das Aufhören der Farbstoffaufnahme in die Zelle bei Gegenwart gewisser höherer Neutralelektrolytkonzentrationen wiederfinden. Doch machen es die starken Abweichungen qualitativer Natur, die zwischen diesen beiden Erscheinungen bestehen, schwierig, eine einfache Beziehung zu finden.

Wie bereits mitgeteilt wurde, steigt bei neutraler und alkalischer Reaktion die Farbstoffmenge, die die Zelle verläßt, wenn der Gehalt der Außenlösung an neutralen Elektrolyten zunimmt. Sind aber H-Ionen in der Lösung vorhanden, so ergibt das Studium der Wirkung von Neutralsalzen andere Verhältnisse, die im wesentlichen durch die beiden folgenden Tabellen wiedergegeben werden.

Solange die Konzentration der H-Ionen noch unter einem Werte ist, der etwa der Konzentration $^1/_{6400}$ Oxalsäure[1]) entspricht, beobachtet man ebenso wie bei neutraler und alkalischer Reaktion, daß die Zellen um so reichlicher den gespeicherten Farbstoff austreten lassen, je höher die Konzentration der Mineralsalze außerhalb der Zelle ist. Steigt die Konzentration der H-Ionen jedoch über diesen Wert, so ergibt sich im wesentlichen folgendes, wenn wir als Beispiel das $NaNO_3$ herausgreifen, dessen Verhalten man als typisch auch bei anderen Salzen wiederfinden kann. Es genügt bei einer Kon-

[1]) Dieser Wert soll keineswegs als Konstante betrachtet werden, deren Lage einwandfrei ermittelt ist. Ihren Wert genau festzustellen, muß, wenn es überhaupt möglich ist, späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

zentration von $^{1}/_{6400}$ Säure bereits eine Konzentration von 0,01 Natriumnitrat, um die Zellen des Elodeablattes völlig zu entfärben, nur in wenigen Zellen zeigt sich noch blauer Zellsaft. Bei einer Konzentration von 0,05 mol. beobachtet man diesen bereits noch in allen Zellen, und bei einem Gehalte von 0,1 mol. $NaNO_3$ in der Außenlösung sind in mindestens der Hälfte der Zellen Niederschläge in Auflösung nachzuweisen. Es vermindert sich demnach in dem Konzentrationsgebiet bis 0,1 Mol. $NaNO_3$ die aus den Zellen austretende Farbstoffmenge um so mehr, je höher die Konzentration des zugesetzten Neutralsalzes ist. Steigert man jedoch diese noch weiter, so entfärben sich bei einer Konzentration von 0,2 mol. Natriumnitrat die meisten Zellen vollständig, nur wenige enthalten noch Niederschläge. Diese Verhältnisse legen den Gedanken nahe, daß das Austreten der Farbstoffbase aus der Zelle in Gegenwart einer bestimmten H-Ionenkonzentration nicht als ein einheitlicher Vorgang aufzufassen sei, sondern daß er sich aus zwei oder mehreren Komponenten zusammensetze. Tatsächlich tritt hier auch der Gerbstoff aus der Zelle heraus und es scheint, wie einige darauf gerichtete Versuche zeigten, die allerdings nur orientierenden Charakter trugen, daß dessen Austreten aus der Zelle durch das Vorhandensein von Neutralsalzen bei saurer Reaktion gefördert wird. Es wäre demnach die bei einer Konzentration von 0,2 mol. Natriumnitrat beobachtete Erhöhung der austretenden Farbstoffmenge mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit auf die Förderung des Durchtrittes der negativen Komponente des Farbstofftannats zurückzuführen. Daß durch den Austritt des Gerbstoffs die exosmierte Menge des Farbstoffs bedeutend vergrößert wird, wurde bereits bei Versuchen beobachtet, die bei neutraler bzw. alkalischer Reaktion mit getöteten Zellen angestellt wurden. In den vorliegenden Versuchen tritt, sobald die Säure den Betrag von $^{1}/_{6400}$ Oxalsäure erreicht hat, der Gerbstoff auch aus der lebenden Zelle heraus. Demgemäß tritt unter diesen Bedingungen Gerbstoff und Farbstoff mit konstanter Geschwindigkeit aus der Zelle heraus. Die Zelle wird demnach um so schneller entleert sein, je schneller eine Komponente des Farbstofftannats aus der Zelle austritt, und es wird jede Beobachtung, die wir bei einer gewissen Höhe der saueren Reaktion in der Außenlösung machen,

schon dadurch keine eindeutige Erklärung zulassen, da, wie bereits an anderer Stelle nachgewiesen wurde, Gerbstoff und Farbstoff weitgehend unabhängig die Zelle verlassen.

Eine Reihe vorläufiger Versuche hatten gezeigt, daß die Säurekonzentration, bei der die Umstimmung erfolgt, in der Nähe des von Czapek[1]) und Kahlenberg und True[2]) ermittelten Wertes von $^1/_{6400}$ n liegt. Diese Konzentration wurde demnach den jetzt näher zu besprechenden Versuchen zugrunde gelegt.

Vorerst mögen die Wirkungen der einzelnen Anionen auseinandergesetzt werden, da die Unterschiede bei Vorhandensein von H-Ionen deutlicher hervortreten, als die an Kationen. Zu diesem Versuche wurden die Salze des Na verwendet. Vergleichen wir zunächst die für die niedrigst untersuchte Säurekonzentration $^1/_{12800}$ n-Oxalsäure erhaltenen Resultate mit den für neutrale Reaktion ermittelten Verhältnissen[3]). Ein vergleichendes Eingehen bis in die Details des in jedem Falle beobachteten Ganges des Farbstoffaustritts erscheint nicht durchführbar, da die beiden Versuche, weder zu gleicher Zeit noch mit gleichem Materiale angestellt, nicht streng vergleichbar sind.

Übereinstimmend ergibt sich dennoch in beiden Versuchsserien, daß die austretende Farbstoffmenge zunimmt, je mehr Neutralsalz in der Lösung vorhanden. Gleich ist auch die Reihenfolge, in der die einzelnen Salze den Farbstoffaustritt befördern. In beiden Fällen ergibt sich folgende Reihe, wenn man die Konzentration 0,05 ins Auge faßt:

Nitrat $<$ Nitrit $<$ Chlorid $<$ Sulfat $<$ Rhodanat $<$ Tartrat $<$ Citrat.

Auch die Sonderstellung des Tartrats und Citrats, die Förderung in niedrigen, dagegen Hemmung in höheren Konzentrationen ist in gleicher Weise zu beobachten. Abweichungen, die über die Unterschiede hinausgehen, die erfahrungsgemäß zwischen Versuchsserien, die mit verschiedenem Material an der gleichen Pflanze angestellt wurden, beobachtet wurden,

[1]) Czapek, Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. Jena 1911, Fischer.

[2]) Louis Kahlenberg und Rodney True, Botan. Gaz. Chicago, 22, 181, 1896; ref. Zeitschr. f. phys. Chem. 22, 1897.

[3]) Siehe darüber Tabelle I der I. Mitteilung, diese Zeitschr. 42, 440.

scheinen darin vorzuliegen, daß in dem Versuche, dem $^{1}/_{12800}$ Oxalsäure zugesetzt war, in den höheren Salzkonzentrationen bedeutend mehr Farbstoff aus der Zelle austritt als bei neutraler Reaktion. Noch deutlicher wird dies bei der zweiten Kontrolle nach 48 Stunden sichtbar.

Einfluß der einzelnen Anionen (Kation Na) auf die Exosmose des Methylenblau aus Elodea bei Gegenwart von H-Ionen.

Serie a, lebende Zellen.

Konzentration der Säure	$^{n}/_{12800}$ Oxalsäure				$^{n}/_{6400}$ Oxalsäure				$^{n}/_{3200}$ Oxalsäure			
Konzentration des Salzes	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2
Nitrat	‖	‖	—(‖)	— ‖	—()	()	—(‖)	—(‖)	—	() ‖	—	—
Nitrit	‖ (‖)	‖ (‖)	— ‖	‖ —	— ‖	‖ —	‖ (‖)	—(‖)	— ‖	—()	‖ —	— ‖
Chlorid	‖ (‖)	‖ —	‖ —	‖ —	()	‖ —	‖ (‖)	— ‖	—(‖)	—(‖)	—(‖)	—
Sulfat	‖	—(‖)	‖ (‖)	—	‖ (‖)	— ‖	— ‖	()	()	—(‖)	—	—[2]
Rhodanat . . .	‖ —	—(‖)	—(‖)	—(‖)[2]	—(‖)	—(‖)	(‖)—	(‖)—[1]	—(‖)	(‖)—	(‖)—[1]	(‖)—[1]
Citrat	(‖)	—(‖)	—(‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	(‖) ‖	(‖)	()	‖ (‖)	()[2]	()[2]
Tartrat	—()	—(‖)	—(‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ —	(‖)—	‖ —	—(‖)	—(‖)	()[2]
Kontrolle . . .	‖				()				()			
Nitrat	‖ —	—(‖)	— ‖	—	—	—	—(‖)	—	·	·	·	·
Nitrit	‖ —	‖ (‖)	—	—(‖)	‖ —	‖ —	(‖)—	—	—	—	—	—
Chlorid	‖	(‖)—	— ‖	—	—	— ‖	— ‖	—	—	—	—	—
Sulfat	‖ (‖)	—	·	—	·	— ‖	—	—	—	—	—	—
Rhodanat . . .	— ‖	—(‖)[1]	—(‖)	—(‖)[1]	—()	·	(‖)—	(‖)—	—	·	(‖)—	(‖)—
Citrat	(‖)—	()—	—(‖)	(‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	‖ (‖)	(‖)	—	‖ (‖)	—	—
Tartrat	(‖)()—	—	—	·	(‖) ‖	‖ —	‖ —	—(‖)	‖ —	—	—	—()
Kontrolle . . .	(‖)—								—			

[1] Auf den Zellen liegen Methylenblaunadeln, die Niederschläge in violett verfärbt.

[2] Plasmolyse erhalten.

‖ bedeutet: Die Niederschläge sind noch intakt.

(‖) „ : Sie befinden sich in blau gefärbtem Zellsaft, Beginn der Auflösung.

() „ : Nur mehr blau gefärbter Zellsaft vorhanden.

— „ : Die Zellen sind leer.

Ist ein Stadium in bedeutend mehr Zellen zu beobachten als ein anderes, so ist es durch fetten Druck gekennzeichnet.

Wird nun die Konzentration der Säure bis $^1/_{6400}$ gesteigert, so ergeben sich bei dieser Konzentration die bereits erwähnten Änderungen der aus der Zelle austretenden Farbstoffmenge. Es ist notwendig, die gleichen Konzentrationen der einzelnen Salze zu vergleichen. In der Konzentration von 0,01 mol. des Nitrats, Nitrits, Chlorids und Rhodanats sind die Zellen fast gänzlich entfärbt. Demgegenüber treten nur sehr kleine Farbstoffmengen aus den Zellen aus, wenn Sulfat, Tartrat und Citrat in der Konzentration 0,01 mol. vorhanden sind. Am stärksten ist der Farbstoff im Nitrat aus den Zellen herausgetreten, hier ist nur mehr in wenigen Zellen blauer Zellsaft vorhanden. Etwas weniger verläßt im Rhodanat die Zellen, wo noch in Auflösung befindliche Niederschläge in einer Minderheit von Zellen vorkommen, im Nitrit sind in manchen Zellen noch intakte Niederschläge nachzuweisen, das Chlorid zeigt in allen Zellen nur mehr blauen Zellsaft. Demgegenüber sind jedoch in Sulfat, Citrat und Tartrat die Niederschläge fast völlig erhalten und nur geringe Mengen Farbstoff sind aus den Zellen herausgetreten. Stellt man hier die einzelnen Salze nach der aus den Zellen ausgetretenen Farbstoffmenge zusammen, so ergibt sich folgende Reihenfolge:

Tartrat $<$ Citrat, Sulfat $<$ Chlorid $<$ Nitrit $<$ Chlorid
$<$ Rhodanat $<$ Nitrat.

Es ist dies die entgegengesetzte, wie sie bei einer Konzentration von $^1/_{12800}$ Oxalsäure und bei neutraler Reaktion beobachtet wurde.

In reinem destillierten Wasser, das nur $^1/_{6400}$ Säure enthält, haben sich die Farbstoffniederschläge in den Zellen aufgelöst und es ist nur mehr blauer Zellsaft in den Zellen vorhanden; Nitrat, Rhodanat, Nitrit fördern demnach den Austritt des Farbstoffes, im Chlorid sind ebensoviele Niederschläge da wie ohne Salzzusatz, Sulfat, Tartrat und Citrat hemmen und verlangsamen den Austritt des Farbstoffes.

In der nächsten untersuchten Salzkonzentration 0,05 mol. vermindert sich im Nitrat, Nitrit und Chlorid die austretende Menge des Farbstoffes. Die Zahl der Zellen, die noch blauen Zellsaft führen, hat im Nitrat zugenommen, so daß dieser jetzt in den meisten Zellen zu finden ist, in Nitrit und Chlorid

zeigt ungefähr die Hälfte der Zellen noch intakte Niederschläge. In Rhodanat, Tartrat und Citrat scheint ebensoviel Farbstoff die Zelle zu verlassen wie in 0,01 mol. Nur im Sulfat ist eine entschiedene Zunahme der austretenden Farbstoffmenge nicht zu verkennen, es hat sich die Hälfte der Zellen völlig entfärbt. Die Reihenfolge der einzelnen Salze hat sich gegenüber der Konzentration 0,01 mol. nicht geändert.

War schon in der Konzentration 0,05 bei einzelnen Salzen eine Abnahme der austretenden Farbstoffmenge zu bemerken, so wird bei einem Gehalte der Außenlösung von 0,1 mol. die Hemmung der Farbstoffexosmose im Nitrat, Nitrit, Chlorid und Rhodanat um so deutlicher. Die größte Farbstoffmenge verläßt im Nitrat die Zellen, darin ist immer noch die Hälfte der Zellen völlig entleert, während das Nitrit und Chlorid in sämtlichen Zellen noch Niederschläge des Farbstoffes aufweisen. Im Nitrit zeigen sich dabei noch in vielen Zellen die ersten Stadien der Auflösung, das Entstehen eines blauen Zellsaftes, während im Chlorid das nur in wenigen Zellen der Fall ist. Auch die weiteren untersuchten Salze lassen eine Verminderung der austretenden Farbstoffmenge erkennen.

Während jedoch im allgemeinen in den bisher untersuchten Salzkonzentrationen eine um so stärkere Abnahme der austretenden Farbstoffmenge stattfand, je größer der Salzgehalt der untersuchten Lösung war, so kann in der Konzentration 0,2 eine entschiedene Förderung der austretenden Farbstoffmenge festgestellt werden. Es ist dies jene Erscheinung, die bereits in der einleitenden allgemeinen Besprechung der hier vorhandenen Beziehungen erwähnt und auf die Förderung der negativen Komponente des Farbstofftannats, des Tannins, zurückgeführt wurde. Deutlich ist diese Förderung bei der ersten Kontrolle in den ersten vier Salzen: Nitrat, Nitrit, Sulfat und Chlorid zu erkennen. In den drei übrigen untersuchten Salzen tritt sie nicht so deutlich hervor, nur beim Tartrat scheint sie ganz leicht angedeutet, da bei Gegenwart dieses Salzes in den Konzentrationen 0,1 und 0,2 wenigstens einige Zellen vollständig entfärbt sind, während in den niedrigen Konzentrationen die Niederschläge intakt sind.

Ist schließlich in der Außenlösung $^{1}/_{3200}$ n-Oxalsäure vorhanden, die höchste untersuchte Säurekonzentration, so tritt

die Beinflussung der Exosmose des Tannins sehr deutlich hervor, und nur noch in den niedrigsten untersuchten Konzentrationen 0,05 mol. und 0,01 mol. mag man noch bei einigen Salzen wie beim Nitrat, Tartrat und Citrat die Hemmung des Austrittes des Farbions wiedererkennen. Doch ergibt sich auch hier für die Hemmung des Farbstoffaustrittes aus der Zelle beim Vergleich der beim Vorhandensein der niedrigsten Salzkonzentration 0,01 erreichten Stadien dieselbe Reihenfolge der einzelnen Anionen, wie sie auch in $^{1}/_{6400}$ Oxalsäure beobachtet wurde. Schon in der nächsten Konzentration wird jedoch die Reihenfolge durch den komplizierenden Einfluß der Tannatexosmose einigermaßen verwischt.

Einfluß der einzelnen Anionen auf die Exosmose des Methylenblaus aus den Zellen von Elodea. Serie b, getötete Zellen.

Konzentration der Säure	$^{n}/_{12800}$ Oxalsäure				$^{n}/_{6400}$ Oxalsäure				$^{n}/_{3200}$ Oxalsäure			
Konzentration des Salzes	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	9,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2
					Kontrolle nach 24 Stunden.							
Nitrat	— II	II	— II	— II	— II	— II	—	—	II —	— II	— II	—
Nitrit	II —	II	II —	— II	II —	II —	— II	—	— II	— II	II	II —
Chlorid . . .	— II	— II	— II	— II	—	— II	— II	II —	—	— II	—	—
Sulfat	II —	II —	II —	— II	—	— II	II	—	— II	— II	— II	—
Rhodanat . .	II —	II	II —	— II	— II	— II[1]	— II[1]	— II[1]	— II	II —	— II	•
Citrat	II	— II	II	— II	II	— II	II	— II	II —	— II	— II	— II
Tartrat . . .	— II	II	II	II	II —	— II	— II	—	— II	II	II	— II
Kontrolle . .	— II				— II				— II			
					Kontrolle nach 48 Stunden.							
Nitrat	— II	— II	— II	— II	II —	— II	—	—	II —	— II	— II	—
Nitrit	•	II —	— II	— II	— II	— II	— II	—	— II	— II	— II	•
Chlorid . . .	—	— II	— II	— II	—	— II	—	— II	—	—	—	—
Sulfat	II —	II —	II —	—	—	II —	II —	—	—	— II	— II	—
Rhodanat . .	—	II —	II —	— II	•	•	•	—	— II	II —	II —	•
Citrat	II —	— II	II —	— ( )	II	— II	II	—	II —	— II	—	— II
Tartrat . . .	•	—	— II	— II	— II	— II	— II	—		II —	II —	—
Kontrolle . .	II —				— II				—			

[1] Blauviolette Nadeln auf den Blättern.

Die toten Zellen verhalten sich insofern abweichend, als bei diesen bereits eine Konzentration der Säure von $^1/_{12800}$ normal genügt, um die typischen Veränderungen im Gange der Exosmose des Farbstoffes hervorzubringen, die an lebenden Zellen erst bei $^1/_{6400}$ n-Säure zu beobachten sind. Das Tannin passiert die toten Zellen auch etwas schneller als die lebenden, wenigstens scheint der Umstand darauf hinzudeuten, daß in $^1/_{12800}$ n-Säure die Zunahme der exosmierten Farbstoffmenge bereits bei 0,1 mol. deutlich ist, während sie bei $^1/_{6400}$ Säure bei lebenden Zellen außer im Sulfat erst bei 0,2 beginnt. Daß die untersuchten lebenden Zellen tatsächlich bei der ersten Kontrolle noch lebend sind, darauf weist der Vergleich mit der Tabelle, die das Verhalten der toten Zellen zeigt, hauptsächlich dadurch hin, daß in den toten Zellen das Auftreten eines blauen Zellsaftes unterbleibt, während dieser in allen lebenden Zellen, die überhaupt noch Farbstoff enthalten, sogar bei einem Gehalte von $^1/_{3200}$ Säure nachzuweisen ist.

Bei der Untersuchung der vorliegenden Versuche nach 48 Stunden konnte nachgewiesen werden, daß die lebenden Zellen nicht wie bei neutraler und alkalischer Reaktion in der Zeit von der ersten bis zur zweiten Kontrolle nur wenig Farbstoff austreten lassen, der Vorgang der Exosmose ist vielmehr in den Säurekonzentrationen von $^1/_{6400}$ weitergegangen und die Zellen haben sich vielfach vollständig entfärbt. Nur im Citrat ist wenig Farbstoff aus den Zellen getreten. In $^n/_{3200}$ Oxalsäure haben sich in fast sämtlichen Salzen beinahe alle Zellen entfärbt, nur im Tartrat und Citrat sind noch Reste der Färbung erhalten. Am meisten Farbstoff ist wohl noch bei Gegenwart des Rhodanats in den Zellen verblieben, doch ist es schwer, diese Beobachtung zu weiteren Schlüssen zu verwenden, da sich namentlich bei saurer Reaktion die Methylenblauniederschläge in der Zelle in Violett verfärben, vielleicht infolge von Bildung von rhodanwasserstoffsaurem Methylenblau. Bei getöteten Zellen ist die Exosmose des Farbstoffes noch nicht so weit gediehen, und es wäre daran zu denken, ob nicht etwa eine durch den heißen Dampf hervorgerufene Koagulation des Protoplasten eine Herabsetzung der Permeabilität gegenüber dem unbehandelten Plasma bedingt. Von lebendem Protoplasma kann man wohl nach 48stündigem Aufenthalte in $^n/_{3200}$ Oxalsäure nicht mehr sprechen.

Einfluß der Kationen auf die Exosmose von Methylenblau aus Elodea.
Serie a, lebende Zellen.

Konzentration der Säure	$^n/_{12800}$ Oxalsäure				$^n/_{6400}$ Oxalsäure				$^n/_{3200}$ Oxalsäure			
Konzentration des Salzes	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2
					Kontrolle nach 24 Stunden.							
Natrium	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	‖—	‖(‖)	‖	‖	—‖	—(‖)‖	‖(‖)	‖—
Kalium	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	‖(‖)	—(‖)	‖	—‖	—‖	‖	‖	‖(‖)
Calcium	‖(‖)	‖(‖)	()	()(‖)	—‖	‖	(‖)	(‖)	‖—	—	‖	‖(‖)
Magnesium	(‖)—	—(‖)	‖(‖)	() (‖)	—‖	—‖	—‖	(‖)	—‖	—(‖)	(‖)—‖	(‖)
Barium	‖(‖)	—(‖)	—(‖)	—(‖)	‖(‖)	—‖	•	‖(‖)	‖(‖)	‖—	‖	‖
Aluminium [1]) . . .	‖(‖)	(‖)—	—‖		‖(‖)	—‖	‖—	‖	‖	‖—	—	
Kontrolle	‖(‖)				—(‖)				-()(‖)			
Neutrale Kontrolle	‖(‖)											
					Kontrolle nach 48 Stunden.							
Natrium	‖(‖)	(‖)—	(‖)—	‖(‖)	—‖	‖—	‖—	‖—	—	—()	—	—
Kalium	—‖	—‖	—(‖)	(‖)—	—‖	—	‖—	—	—‖	—‖	—‖	—(‖)
Calcium	—(‖)	—(‖)	()	()	—	—(‖)	—[2]	—(‖)[2]	—‖	—	—‖	—
Magnesium	(‖)—	—(‖)	(‖)—[2]	() (‖)—[2]	—	—‖	—	—(‖)[2]	—‖	—(‖)	—‖	—
Barium	‖(‖)	(‖)‖	(‖)()	—	—(‖)	—‖	—‖	(‖)	—‖	‖—	‖—	‖—
Aluminium	—(‖)	-(‖)[2]	—(‖)[2]	—	—(‖)	—‖	—‖	—	‖	—‖	—	
Kontrolle	‖(‖)				—(‖)				—()			
Neutrale Kontrolle	‖(‖)											

[1]) Die Konzentrationen des Aluminiums sind 0,1, 0,05, 0,025, 0,01 mol.
[2]) Plasmolyse erhalten.

Benutzt wurden je 50 ccm Lösung. Das Anion der untersuchten Salze war Cl′.

Bei der Untersuchung der einzelnen Kationen wurden im wesentlichen dieselben Beziehungen gefunden, die bereits in der ersten Versuchsreihe über die Wirkung der Anionen auseinandergesetzt wurden. Versehentlich wurde in dieser Serie auch zur Untersuchung des Ca Oxalsäure verwendet, dies bedingt eine geringfügige Verminderung des Ca-Gehaltes der Lösung, da ein Äquivalent der zugesetzten Oxalsäure als oxalsaurer Kalk gefällt wurde, eine Verminderung der H-Ionenkonzentration tritt dadurch nicht ein.

Einfluß der Kationen (Anion Cl′) auf die Exosmose von Methylenblau aus Elodea.
Serie b. Die Zellen sind durch Dampf getötet.

Konzentration der Säure	$^n/_{12800}$ Oxalsäure				$^n/_{6400}$ Oxalsäure				$^n/_{3200}$ Oxalsäure			
Konzentration des Salzes	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2	0,01	0,05	0,1	0,2
					Kontrolle nach 24 Stunden.							
Natrium	‖	‖	‖	—	—‖	—‖	‖—	‖—	‖—	‖—	‖—	—
Kalium	‖—	‖—	—	—	—‖	—‖	verl.	—	—	‖	—	—‖
Calcium	—‖	—‖	—	—	—‖	—‖	—‖	—	—	—‖	—	—‖
Magnesium	—‖	‖	—	—	—	—‖	—‖	—‖	—‖	‖—	—‖	‖
Barium	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	‖	‖
Aluminium [1]) . . .	—‖	—	—	—	—	—	—‖	—‖	—‖	—‖	‖	—
Kontrolle	—‖				—				—			
Neutrale Kontrolle	‖											
					Kontrolle nach 48 Stunden							
Natrium	—‖	—‖	—‖	—	—‖	—	—	—‖	—	—‖	—	—
Kalium	—‖	—‖	—	—	—	—‖	verl.	—	—	—‖	—	—
Calcium	—‖	—‖	—	—	—‖	—‖	—‖	—	—	—	—	—
Magnesium	—‖	—‖	—	—	—	—‖	—	—‖	—	—	—	—‖
Barium	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—‖	—‖
Aluminium [1]) . . .	—‖	—	—	—	—	—	—‖	—	—	—	—‖	—
Kontrolle	—				—				—			
Neutrale Kontrolle	—‖											

[1]) Siehe Serie a.

In $^1/_{12800}$ n-Säure findet man ebenso wie in der ersten Versuchsserie die Erhöhung der austretenden Farbstoffmenge mit der Konzentration des betreffenden Salzes. Auch die Reihenfolge der einzelnen Ionen in bezug auf ihr Vermögen, den Farbstoffaustritt aus der Zelle beschleunigen zu können, ist dieselbe geblieben. In beiden Fällen ergibt sie sich

$$\text{Na, K} < \text{Ca} < \text{Mg} < \text{Ba,} < \text{Al.}$$

Dennoch liegen auch hier Abweichungen vor. Abgesehen von kleineren Ungleichheiten, die vielleicht im Bereiche der Beobachtungsfehler liegen könnten, muß namentlich das Verhalten des Al hervorgehoben werden. Bei neutraler Reaktion hemmt

das Al vollständig den Austritt des Farbstoffes, sobald es einmal die Konzentration 0,01 mol. erreicht hat. Bei ganz schwachsaurer Reaktion dagegen ist sowohl in 0,05 wie in 0,01 mol. eine völlige Entfärbung zahlreicher Zellen, in dem einen Falle beinahe aller, in dem andern ungefähr der Hälfte eingetreten.

In $^1/_{6400}$ Oxalsäure jedoch tritt die größte Farbstoffmenge in 0,01 aus den Zellen aus, abweichend verhält sich nur das Al und Ba. Bei einer weiteren Steigerung des Salzgehaltes beginnt bereits, wie bei der Beschreibung der ersten Serie erörtert wurde, die Hemmung des weiteren Farbstoffaustrittes. Bei Na, K, Ca, Mg ist diese Abnahme der ausgetretenen Farbstoffmenge sehr gut zu verfolgen. Abweichend verhält sich auch hier das Ba und das Al. Bei diesen nimmt die exosmierte Farbstoffmenge zu bis zur Konzentration 0,1 mol. Erst bei 0,2 mol. kann bei den Salzen dieser beiden Kationen die Hemmung des Farbstoffaustrittes bemerkt werden. Bei dieser Konzentration des zugesetzten Salzes bewirken die übrigen Kationen bereits wieder eine Steigerung der exosmierten Farbstoffmenge, da sie die Exosmose des Tannins sehr stark fördern. Wenn man es versucht, analog wie es mit der Wirkung der Anionen geschah, auch die Wirkung der Kationen durch Ordnung der einzelnen nach ihrem Vermögen, den Farbstoff aus der Zelle zu verdrängen, in einer Reihe darzustellen, so erhält man folgende:

$$\mathrm{Al} < \mathrm{Ba} \parallel < \mathrm{K} < \mathrm{Na} < \mathrm{Ca} < \mathrm{Mg}$$

für die Konzentration 0,01 mol. Die Umkehrung der Reihe läßt sich demnach hier nicht ebenso wie bei $^1/_{6400}$ Oxalsäure durchführen, wenn man die einzelnen Anionen vergleicht. Die letzten 4 Elemente der Reihe zeigen wohl die umgekehrte Reihenfolge, doch verhalten sich Al und Ba abweichend. Auch bei anderem Salzgehalte kann man die Umkehrung der Reihe nicht feststellen, vielmehr ist sogar in 0,1 mol. noch dieselbe Reihenfolge erhalten, wie man sie sonst bei neutraler und alkalischer Reaktion erhält. Es muß allerdings bemerkt werden, daß die Unterschiede zwischen Al und Ba einerseits und den übrigen untersuchten Kationen andererseits bedeutend größere sind, als sie zwischen irgendwelchen der geprüften Anionen vorliegen.

Eine deutliche Umkehrung der Reihenfolge der einzelnen Kationen ist erst bei der Konzentration $^1/_{3200}$ Oxalsäure festzustellen. Hier erhält man tatsächlich beim Vergleiche der Konzentrationen 0,01 mol. die Reihenfolge

$$Al < Ba < Mg < Ca < K, Na.$$

Die 2. Kontrolle nach 48 Stunden zeigte nichts wesentlich Neues gegenüber der 1. Versuchsserie. Das Weitergehen der Farbstoffexosmose kann ebenso in den Säurekonzentrationen von $^1/_{6400}$ n-Säure beobachtet werden, nur das Ba läßt den Farbstoff namentlich in den höheren Konzentrationen nur in geringerem Maße austreten, während in den niedrigen Konzentrationen nur in wenigen Zellen noch Niederschläge erhalten bleiben.

Während jedoch in der ersten berichteten Versuchsserie über die Wirkung der einzelnen Anionen an den getöteten Zellen schon bei der Konzentration von $^1/_{12800}$ Säure die umgekehrte Reihenfolge der einzelnen Ionen festgestellt wurde, so läßt sich dies hier in keiner Weise durchführen. Wenn es auch stellenweise möglich ist, deutlich bei einer Säurekonzentration von $^1/_{6400}$ n-Oxalsäure denselben Gang der Farbstoffexosmose wiederzufinden, wie er bereits an lebenden Zellen vorgefunden wurde, so ist es doch nicht möglich, für die einzelnen Ionen eine Reihenfolge festzustellen, die für mehr als für irgendeine bestimmte Konzentration Geltung hätte. In $^n/_{12800}$ kann dieselbe Reihenfolge der Ionen wie auch sonst bei neutraler und alkalischer Reaktion beobachtet werden.

Wenn man zum Schlusse dieses Abschnittes noch einmal rekapituliert, was über die Salzwirkung bei Anwesenheit von Säure gesagt wurde, so ergibt sich folgendes. Bei Gegenwart von $^1/_{12800}$ Säure zeigen die Zellen von Elodea noch dasselbe Verhalten wie bei neutraler Reaktion, von $^1/_{6400}$ Säure an nimmt die austretende Farbstoffmenge bei saurer Reaktion ab, um dann wieder zuzunehmen, wenn der Salzgehalt einen bestimmten Wert erreicht hat. Die Reihenfolge der Anionen kehrt sich bereits bei $^1/_{6400}$ Säure um, die der Kationen erst bei $^1/_{3200}$ Oxalsäure. Die H-Ionenkonzentration der untersuchten Säurelösungen betrug, da die Oxalsäure bei diesen Verdünnungen als völlig dissoziiert zu betrachten ist, $1{,}56 \cdot 10^{-4}$ n-H in der Kon-

zentration $^{1}/_{6400}$ n-Oxalsäure, $0{,}78 \cdot 10^{-4}$ in der Konzentration $^{1}/_{12800}$ n-Oxalsäure. Die Deutung dieser Vorgänge muß der allgemeinen Diskussion der Ergebnisse vorbehalten werden.

III. Die Einwirkung von Salzen, OH- und H-Ionen auf die Farbstoffdiosmose bei verschiedenen Temperaturen.

Von einer gewissen Bedeutung für das Verständnis der Einwirkung verschiedener Ionen ist die Kenntnis ihrer Veränderungen bei verschiedener Temperatur. Sowohl die Diffusion wie die elektrische Adsorption wird durch Temperaturerhöhung gefördert, während die Adsorption infolge des Vorhandenseins eines Oberflächenspannungsgefälles bei erhöhter Temperatur, wenn auch nur in unbedeutendem Maße, vermindert wird.

Die bei konstanter Alkali- und Salzkonzentration vorhandene Beeinflussung der Farbstoffaufnahme durch verschiedene Temperaturen ergibt das folgende Protokoll.

Es wurden zwei Serien angestellt; die eine betraf das Verhalten von Elodea, die zweite das einiger Meeresalgen.

Serie a: Moldauwasser $^{1}/_{2000}$ % Neutralrot;
„ b: Adriawasser „ „

Diese wurden aufgestellt:

1. zwischen Doppelfenster, 2°,
2. bei Zimmertemperatur, 15 bis 18°,
3.} 4.} in zwei verschiedene Thermostaten, 30°,
5. Thermostat, 40°.

a) Elodea.

2°. Besonders die Zellen um das Leitbündel sind gefärbt, die anderen Zellen enthalten schwächere Farbstoffniederschläge in Form kleiner, in Brownscher Molekularbewegung befindlicher Körperchen.

15 bis 18°. Die Zellen des Blattes sind bedeutend stärker gefärbt.

30°. Es ist nicht viel Unterschied gegenüber 15° bis 18° zu bemerken, vielleicht ist die Färbung etwas stärker.

40°. Es ist keine Färbung eingetreten, nur die Gerbstoffidioblasten speichern den Farbstoff stark. Die Zellen sind stark geschädigt.

b) Ulva.

Die Zahl und Intensität der gefärbten Zellen steigt wie bei Elodea bis zu einem bei 30° gelegenen Optimum, dann jäher Abfall bis 40°.

c) Udotea Desfontainii.

zeigt nur bei Zimmertemperatur Färbung, darüber oder darunter sind die Zellen leer.

d) Nitophyllum punctatum.

Bei 2° ist die stärkste Färbung, darüber und darunter geht die Färbung deutlich zurück. Es sind weniger Zellen und diese wenig intensiv gefärbt. Die Zellen haben bei 30° im Thermostaten schon etwas gelitten. Die unversehrten Exemplare des Thallus zeigen jedoch keine Spur von Färbung.

Verfolgt man die Einwirkung von Neutralsalzen bei verschiedener Temperatur, so erhält man folgende Resultate:

Serie a 15°, Serie b 30 bis 35° Thermostat.

Es wurde 0 bis 1 mol. van't Hoff, zu je 0,1 mol. abgestuft, mit Zusatz von $^1/_{2000}$ Neutralrot und $^1/_{1000}$n-Natriumbicarbonat untersucht.

	Serie a:	Serie b:
	Elodea.	
0	In den Zellen dunkle Niederschläge, ferner in vielen Zellen Körner in Brownscher Molekularbewegung.	Die Zellen der ganzen Blattfläche sind gestopft voll Niederschläge, rote Zellsaftfärbung, hin und wieder auch Körnchen in Brownscher Bewegung.
0,1	Niederschläge in den Zellen, blaurote Körnchen, nur wenige Zellen ohne Plasmolyse.	Die Niederschläge nehmen an Volumen ab, namentlich in den Zellen d. Blattflächenbasis blauviolette Körnchen. Beginn der Plasmolyse.
0,2	Plasmolyse in sämtlichen Zellen, Niederschläge in rotem Zellsaft.	Die Niederschläge nehmen ab.
0,3	Maximum der Färbung. Die Zellen voll Niederschläge, daneben ist noch Zellsaftfärbung erhalten.	do.
0,4	Zurückgehen der Färbung, dagegen enthalten die Zellen der Blattbasis noch reichliche Niederschläge.	do.
0,5	Weiteres Zurückgehen der Färbung.	Schon viele ungefärbte Zellen.
0,6	do.	do.
0,7	Die Färbung ist bereits in den meisten Zellen verschwunden, nur die Zellen gegen die Blattspitze sind noch gefärbt.	
0,8	Nur in den Idioblasten ist noch Färbung, Form und Leben ist völlig erhalten.	Nirgends Färbung, das Plasma hat nicht mehr die typische Kugelform, sondern es ist mehr minder zackig. Das Chlorophyll ist noch frisch grün.
0,9 n	Wie 0,8.	Ebenso wie 0,8.

	Serie a:	Serie b:
	Vallisneria spiralis.	
0	Färbung der Wundstelle und der in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Zellen, auch solcher im Blatte.	Wie in Serie a.
0,1	Die Färbung wird stärker, leichte Niederschläge in manchen Zellen.	Ebenso, vielleicht schon weniger.
0,2	Plasmolyse, gefärbte Zellen mit schwachen Niederschlägen über die ganze Blattfläche verbreitet.	Plasmolyse beginnt. Die Zellen sind nur in der Nähe der Wundstelle gefärbt und hin und wieder gibt es Niederschläge in Zellen des Blattinnern.
0,3	Ungefähr wie 0,2. Vielleicht ist hier die stärkste Färbung, doch ist es nicht mit Bestimmtheit zu entscheiden, ob 0,2 oder 0,3 stärker gefärbt ist.	Die Färbung nimmt ab.
0,4	Die Zahl der gefärbten Zellen ist gleich geblieben, aber ihre Intensität hat bedeutend nachgelassen.	Nur noch wenige Zellen an der Wundstelle sind gefärbt.
0,5	Weiteres Zurückgehen der Färbung.	Alle Färbung verschwunden.
0,6	Nur einzelne Zellen gefärbt, andere sind ungefärbt.	
0,7	Ebenso.	
0,9 n	Keine Färbung mehr.	
	Ulva lactuca.	
	Von 0,3 steigt die Färbung bis zu einem bei 0,6 gelegenen Maximum und klingt von dort allmählich nach beiden Seiten ab, ohne in dem untersuchten Konzentrationsgebiet völlig zu verschwinden.	Die beste Färbung ist bei 0,6, keinesfalls bei 0,7; von dort Abklingen nach beiden Seiten. In 0,9 und normal ist die Färbung bereits völlig verschwunden.
	Nitophyllum punctatum; Cladophora trichotoma.	
	In Serie b ist die Temperatur durchweg ultraoptimal und die Thalli sind bereits tot.	

Die gespeicherte Farbstoffmenge nimmt mit Steigerung der Temperatur anfangs zu, und zwar läßt sich diese Zunahme bis etwa 30° feststellen. Darauf nimmt sie im Gebiete von 30 bis 40° ab. Die Förderung der Adsorption an der Plasmaoberfläche einerseits, andererseits die Beschleunigung der Diffusionsvor-

gänge begründen wohl die Förderung des Farbstoffeintrittes. Welche Faktoren aber an der folgenden Hemmung der Farbstoffaufnahme beteiligt sind, ist nicht ohne weiteres aus der ersten Versuchsserie zu ersehen. Man könnte vielleicht irgendwelche Verdichtungsvorgänge im Protoplasten für diese Hemmung der Permeabilität verantwortlich machen, doch wird diese Annahme durch das Verhalten von Nitophyllum als unwahrscheinlich dargetan, das bereits über 2° eine Verminderung der eintretenden Farbstoffmenge zeigt. Eine andere Vorstellung läßt sich auf Grund der Versuche über Salzeinwirkung geben. Sobald man bei konstanter Konzentration des Farbstoffes die des zugesetzten Neutralsalzes steigert, wird nicht nur die Adsorption des Farbstoffes an der Plasmaoberfläche mit der Temperatur zunehmen, sondern es wird auch das Salz stärker adsorbiert; es wird demnach leichter imstande sein, den Farbstoff von der Plasmamembran zu verdrängen. Dadurch wird wohl die optimale Färbung, wenn bei einer Salzkonzentration eine solche vorliegt, wie auch die Hemmung der Farbstoffaufnahme bei einer niederen Konzentration des Salzes eintreten. Im Falle von Nitophyllum wäre demnach die Verminderung der Aufnahme des Farbstoffes auf eine erhöhte Adsorption der Salze des Meerwassers an der Plasmaoberfläche zurückzuführen.

Der Temperatureinfluß auf die Wirkung der OH- und H-Ionen wurde an Elodea untersucht. Zugrunde gelegt wurde eine Konzentration von 0,1 mol. van't Hoff mit Zusatz von $^1/_{2000}\,\%$ Neutralrot. Geprüft wurden in je 100 ccm Lösung $^n/_{1000}$-, $^n/_{10000}$-Normalsoda, 0, $^n/_{100000}$-, $^n/_{10000}$-H_2SO_4. Die Resultate seien in folgendem Schema wiedergegeben.

Temperatur	$NaHCO_3$		0	H_2SO_4	
	$^n/_{1000}$	$^n/_{10000}$		$^n/_{100000}$	$^n/_{10000}$
10° bis 14°	↓	←	+	+	+
30°	↓	←+	←↑	←↑	←↑
34° bis 36°	+	←↑	←↑	←↑	←↑

Das Kreuz bedeutet für jede OH- und H-Ionenkonzentration, bei welcher Temperatur die stärkste Färbung eingetreten ist. Die Pfeile deuten die Richtung des Ansteigens der gespeicherten Menge an.

Die aufgenommene Farbstoffmenge ist nach dieser Tabelle eine Funktion der vorhandenen OH-Ionenkonzentration und der Temperatur. Je höher die Temperatur, desto höher muß auch die vorhandene Alkalikonzentration sein, damit reichliche Speicherung erzielt werden kann. Bei 34° bis 36° ist die stärkste Färbung bei $^{n}/_{1000}$-Alkali, bei $^{n}/_{10000}$-Alkali bei 30°. Ist aber kein Alkali vorhanden oder sind sogar freie H-Ionen anwesend, so ergibt sich die stärkste Färbung bei 10° bis 14°. Man kann also nicht schlechthin von einer Optimaltemperatur der Färbung sprechen, sondern deren Wert steht in innigem Zusammenhange mit der vorhandenen Salz- und namentlich mit der OH-Ionenkonzentration. Dies ist auch für die Beurteilung der Lebensfähigkeit eines Organismus bei bestimmten höheren Temperaturen von größter Bedeutung; wie Beobachtungen orientierender Art darüber zeigten, hängt die Temperaturgrenze des Lebens wesentlich mit von der OH-Konzentration der Außenlösung ab.

IV. Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Farbstoffaufnahme.

Neben der Einwirkung der Salze wurde auch eine Reihe anderer Stoffe auf ihr Vermögen, den Durchtritt des Farbstoffes durch das Plasma zu ändern, geprüft, in der Erwartung, weiteres Material zur Deutung dieser Vorgänge zu erhalten. Namentlich war damit die Absicht verbunden, einen ev. Anteil des osmotischen Druckes der zugesetzten Substanz an der Änderung der Farbstoffdiosmose isoliert zu beobachten, wenn Nichtelektrolyte, bzw. Elektrolyte, die das Protoplasma gut passieren können, zur Anwendung kamen. Die Untersuchung der Alkohole und Emulsionskolloide sollte über einen ev. Einfluß der Oberflächenspannung Aufschluß geben.

a) Elektrolyte, Material Elodea.

Harnstoff.

Dieser dringt ausgezeichnet in die Zellen ein, es ist daher nirgends Plasmolyse zu bemerken. Bei 0,1 und 0,2 zeigt das Neutralrot die Farbe der freien Base. Von da an zeigen nur die Idioblasten Färbung.

Asparagin.

Untersucht wurden die Konzentrationen: 0,1, 0,05, 0,01, 0,001. Es hemmt die Farbstoffaufnahme bereits in 0,001 mol., in 0,01 ist bereits der größte Teil der Färbung verschwunden. Hervorzuheben ist die starke

Membranfärbung, die sich bis zur konzentrierten Lösung hinauf einstellte. Um den Einfluß der H-Ionen des Asparagins auszuschalten, wurde in einem Parallelversuche zu jedem Glase eine Skalpellspitze Calciumcarbonat zugefügt. Dieses hatte einen Teil des Farbstoffes aufgenommen, die Färbungen waren demnach weniger intensiv. Es war hier kein Abflauen der Färbung zu bemerken, eher stieg die Färbung, aber nur minimal bis zur konzentrierten Lösung. Daß das Asparagin tatsächlich noch in Lösung war, zeigten vergleichende Fällungen mit Alkohol. Die hemmende Wirkung des Asparagins war demnach auf reine H-Ionen zurückzuführen.

Man könnte daran denken, die hemmende Wirkung des Harnstoffes vor allem auf die infolge seiner Hydrolyse relativ hohe OH-Ionenkonzentration zurückzuführen. Doch verdanke ich einer privaten Mitteilung des Herrn Dr. Szücs die Angabe, daß Harnstoff die Wirkung von Al-Salzen auf die Zelle zu paralysieren vermag, wenn man es vorher von der Zelle aufnehmen ließ. Es liegt demnach wohl ein komplizierterer Zusammenhang vor.

Die Wirkung des Asparagins ist wohl vor allem auf reine H-Ionen, die es in neutraler Lösung abdissoziiert, zurückzuführen. Dafür spricht die Beobachtung, daß eine, wenn auch schwache Förderung der Aufnahme des Farbstoffes durch Gegenwart des Asparagins erzielt werden kann, wenn durch Zusatz von Calciumcarbonat usw. für die Neutralisierung desselben gesorgt ist.

b) Nichtelektrolyte.

Zucker (Elodea).

Milchzucker.

Geprüft wurden Konzentrationen von 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,001, 0,0001, 0 normal mit Neutralrot.

In 0,6 völlige Hemmung der Farbstoffaufnahme, ohne daß sich ein Maximum der Farbstoffaufnahme feststellen läßt.

Glucose.

Serie a: Neutral.

Serie b: Mit Zusatz von 0,002 n-KOH.

Die Hemmung ist in der neutralen Versuchsreihe bereits bei 0,2 deutlich, bei 0,4 verschwindet die Färbung vollständig. In der KOH-haltigen Lösung ist die Färbung bis 0,4 unverändert, geht aber im Raume 0,4 bis normal zurück.

Fructose

hemmt von 0,6 an, in 0,8 norm. zeigen fast nur die Idioblasten Färbung, in 0,4 beginnt die Färbung.

Zucker hemmen demnach den Eintritt des Farbstoffes in die Zellen, und ihre Wirkung wird durch OH-Ionen ebenso aufgehoben wie die der Neutralsalze. Bekanntlich lassen sich die verschiedenen Zuckerarten durch Kohle adsorbieren, und man wird demnach annehmen müssen, daß auch die Zucker, gleichwie die Salze, vom Plasma adsorbiert werden. Dafür sprechen auch die Analogien, die darin liegen, daß die Wirkung der Zucker gerade so durch OH-Ionen paralysiert werden kann wie die Hemmung durch Salze. Die Stärke der durch die einzelnen Zucker bewirkten Hemmung scheint irgendwie von ihrer Konstitution abzuhängen. Man kann sie in eine Reihe ordnen, wenn man sie nach der Größe der Konzentration, die eben hinreicht, um völlige Hemmung der Farbstoffaufnahme zu erzielen, hintereinander stellt. Allerdings läßt sich diese nur schwierig genügend genau bestimmen. Wir erhalten demnach:

Fructose 0,8 $<$ Milchzucker 0,6 $<$ Glucose 0,4.

Dies beweist auch, daß bei der Wirkung der Zucker osmotische Einflüsse von keiner Bedeutung sein können.

Ruhland[1]) hat nun nachgewiesen, daß die Plasmolyse durch Fructose bei der Zuckerrübe sowohl erst bei höherer Konzentration zu erreichen ist, wie daß sie auch bedeutend schneller zurückgeht. Das Plasma der Zuckerrübe ist demnach für Fructose bedeutend permeabler als für Glucose. Daneben steht meine Beobachtung, daß die Fructose bedeutend schwächer die Farbstoffaufnahme hemmt, als die Glucose. Diese beiden Tatsachen sind sicher innig verknüpft, doch sind die Beziehungen zwischen Adsorbierbarkeit und Diffusionsfähigkeit durch den Protoplasten noch viel zu wenig geprüft, als daß es möglich wäre, den Zusammenhang zu diskutieren.

Alkohole.

Die Versuche mit Alkoholen wurden in der Absicht angestellt, um Resultate über die Bedeutung der Oberflächenspannung bei dem Vorgange der Farbstoffspeicherung zu erhalten.

---

[1]) Ruhland, Jahrb. f. wiss. Botan. 50, Heft 2, S. 230.

Sie ergaben folgendes:

Methylalkohol:	noch Niederschläge	beobachtet	10%,	leere	Zellen	12%
Äthylalkohol:	„	„	12%	„	„	15%
Propylalkohol[1]):	„	„	4—6%	„	„	
Amylalkohol:	„	„	2%	„	„	3%

Kolloide.

Der Einfluß von Kolloiden auf die Schnelligkeit der Aufnahme von Stoffen wurde von Simons[2]), Hausmann[3]), Buglia[4]), Török[5]) und Pantanelli[6]) und anderen Forschern geprüft. Simons fand, daß kleine Mengen von verschiedenen Kolloiden die Adsorption des Strychnins nur unbedeutend verzögern, während mit der Vergrößerung der zugesetzten Kolloidmenge diese Verzögerung meßbar wird. Hausmann machte analoge Beobachtungen über die Herabsetzung der Giftigkeit des Strychnins bei intravenöser Injektion, wenn gleichzeitig Gummiarabicum und andere Kolloide in das Blutgefäß eingespritzt werden. Buglia wies nach, daß

[1]) Die Zellen sind in den höheren Konzentrationen sehr stark geschädigt. Solange in den tannathaltigen Zellen noch der Gerbstoff vorhanden war, konnte keine Herabminderung der eingetretenen Farbstoffmenge gefunden werden, abgesehen von Unregelmäßigkeiten, die im Bereiche der Versuchsfehler blieben. Ob Verschiedenheiten in der Geschwindigkeit der Farbstoffaufnahme vorhanden sind, wurde nicht untersucht. Die Ablesung der gespeicherten Farbstoffmengen nach 12 Stunden ergab ihre annähernde Gleichheit. Annähernd bei denselben Konzentrationen, wie es auch Czapek gefunden, tritt der Gerbstoff aus den Zellen heraus und es kann keine Speicherung stattfinden, da der speichernde Stoff aus der Zelle verschwunden ist. Diese Versuche haben demnach nichts über die Bedeutung der Oberflächenspannung der Zelle für die Farbstoffspeicherung ergeben. Fetthaltige Samen speichern jedoch, in Alkoholen von steigender Konzentration untersucht, den Farbstoff in unverminderter Menge. Um bei diesen feststellen zu können, ob die hemmende Wirkung an Salzen bei Gegenwart von Alkoholen sich ändert, wurde eine Parallelserie des bereits berichteten Versuchs über die Wirkung von Neutralsalzen auf die Speicherung von indigsulfosaurem Na in Fetttröpfchen in der Zelle aufgestellt. Die Ergebnisse dieser Serie unterschieden sich durch nichts von den dort berichteten. Dies scheint wohl darauf hinzuweisen, daß die Adsorption von Salzen im Protoplasma wesentlich als ein Vorgang elektrischer Natur aufzufassen ist. Wie weit allerdings elektrocapillare Vorgänge von Bedeutung sind, können nur weitere Untersuchungen lehren.

[2]) Simons, diese Zeitschr. 22, 394, 1909.

[3]) Hausmann, diese Zeitschr. 22, 1909.

[4]) Buglia, diese Zeitschr. 22, 1, 1909.

[5]) Török, Centralbl. f. Physiol. 20, 206 bis 209, 1906.

[6]) Enrico Pantanelli, Annal. di Botan. 5, 1907; Rendiconti della R. Accademia dei Lincei Classe di science fis. et matematiche 15, 7.

die Adsorption von Kochsalzlösung im Darm nicht erleichtert wird, wenn man ihre Oberflächenspannung durch Zusatz von gallensauren Salzen, Seifen oder Alkohol erniedrigt. Török zeigte ebenso, daß sie sogar erschwert wird, wenn man ihr Öl oder Gummi zusetzt. Die beiden Autoren ziehen aus ihren Ergebnissen den Schluß, daß die Oberflächenspannung keine Rolle bei der Aufnahme von Salzen spielen könne, da ihre Änderung ohne Bedeutung für die Resorptionsvorgänge sei.

Pantanelli fand dagegen in seinen Untersuchungen, daß die Sekretion der Hefeinvertase durch Zusatz verschiedener elektronegativer Kolloide gehemmt werde. Trägt man die nach seinen Messungen bei Anwesenheit verschiedener Kolloidmengen ausgeschiedenen Invertasemengen so in eine Kurve ein, daß auf der Abszisse die jeweilig vorhandenen Kolloidmengen, auf der Ordinate dagegen die Invertasemengen zu stehen kommen, so fällt die erhaltene Kurve bereits bei Zusatz kleiner Kolloidmengen steil herab, worauf bei weiterem Zusatz ein flacherer Verlauf folgt. Die Invertase[1]) wandert selbst in saurer Lösung anodisch, hat demnach ausgesprochenen Säurecharakter. Man könnte daran denken, daß diese Herabsetzung der ausgeschiedenen Invertasemenge als negative Adsorption zu deuten sei, doch fehlen leider experimentelle Daten, um dies nach dem Ostwaldschen Vorgange zu verifizieren.

Die Resultate dieser Untersuchung sind folgende: Eine Versuchsreihe, die den Einfluß einer Reihe von Kolloiden: Stärke, Dextrin, Pepton, Gummiarabicum, Mastix auf den Gang der Veränderung der aufgenommenen Farbstoffmenge bei steigendem Gehalte von Neutralsalzen dartun wollte, zeigte, daß diese weder die Lage des Optimums der aufgenommenen Farbstoffmenge beeinflussen, noch von irgendwelchem Einfluß auf die Hemmung der Farbstoffaufnahme durch Salze sind. Die Färbungen sind aber nicht so intensiv wie in der Parallelreihe ohne Kolloidzusatz. Nur bei Gummiarabicum schien das Optimum der Farbstoffaufnahme bei einem etwas niederern Salzgehalte zu liegen, als im Kontrollexemplar, dies ist aber wohl durch die in diesem Kolloid enthaltenen H-Ionen bedingt.

Das folgende Protokoll gibt die für Mastix, Dextrin und Pepton Witte an Elodea bei Beobachtung des Austrittes von Methylenblau gewonnenen Resultate. Die Mastixlösung wurde hergestellt, indem so lange alkoholische Mastixlösung in Wasser gegossen wurde, bis sich ein intensiv weißes Suspensoid gebildet hatte, dieses wurde bis auf die Hälfte seines Volumens auf dem Wasserbade eingedampft, wobei sicher sämtlicher Alkohol abdestillierte, und wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

[1]) Michaelis, diese Zeitschr. 19, 181, 1909.

	Lebende Zellen						Tote Zellen					
Mastix	0	1/20	1/10	1/4	1/2	Ausgangslösung	0	1/20	1/10	1/4	1/2	Ausgangslösung
	‖	‖	‖	‖	‖	– (‖)	– ‖	– ‖	– ‖	– ‖	–	– ‖
Dextrin	0	1/10 %	1/4 %	1/2 %	1 %	2 %	0	1/10 %	1/4 %	1/2 %	1 %	2 %
		‖	‖	(‖) –	– ‖	– ‖		– ‖	– ‖	– ‖	– ‖	–
Pepton	0	1/20 %	1/10 %	1/4 %	1/2 %	1 %	0	1/20 %	1/10 %	1/4 %	1/2 %	1 %
		‖	‖	‖	‖ (‖)	– ‖		(‖) ‖	–	–	–	–

Diese Versuche zeigten, daß sowohl die aus der Zelle austretende Farbstoffmenge durch vorhandene Kolloide vermehrt wird, während die gespeicherte Menge vermindert wird. Da aber suspensoide und emulsoide Kolloide von gleicher Wirksamkeit sind, so kann diese Tatsache nicht auf Änderungen des Oberflächenspannungsgefälles der Plasmahaut-Außenlösung beruhen, da dies durch suspensoide Kolloide nicht geändert wird. Von Bedeutung ist vielmehr nur die adsorbierende Oberfläche der dispersen Phase des zugesetzten Kolloides. Die Farbstoffe werden jetzt ebenso von dem Kolloid wie vom Plasma adsorbiert und dies bedingt eine Verminderung der wirksamen Konzentration des Farbstoffes in der Außenlösung. Es kann also sowohl weniger Farbstoff aufgenommen werden, wie auch mehr Farbstoff aus der Zelle austreten muß, damit jene Konzentration in der Außenlösung erreicht werden kann, die eben die weitere Exosmose des Farbstoffes sistiert. Auf diese Ursache sind wohl auch die Ergebnisse von Buglia und Török zurückzuführen. Nicht Unterschiede der Oberflächenspannung dürften es sein, die die von diesen Autoren beobachtete Herabsetzung an Resorption bedingen, sondern wirksam dürfte wohl nur die durch die Adsorption an der gewaltigen Oberfläche des zugesetzten Dispersoids herabgesetzte Konzentration des Adsorbendums sein.

V. Diskussion der Resultate, Ableitung der Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes des Protoplasten.

Die vorgebrachten Ergebnisse haben zur Genüge dargetan, daß die Aufnahme des Farbstoffs in bestimmter, oft ziemlich komplizierter Weise von anderen zu gleicher Zeit im Außen-

medium vorhandenen Substanzen abhängt. Es ist auch nachgewiesen worden, daß diese Änderungen der Speicherung bzw. der Exosmose von Farbstoffen nicht etwa durch Änderungen der Aufnahmefähigkeit des speichernden Stoffes bedingt sind, sondern daß sie auf Verschiedenheiten des zwischen Zellsaft und Außenlösung geschalteten Diaphragmas, des Protoplasmas, zurückzuführen sind. Es ist aber nicht leicht zu entscheiden, welchen Anteil der Protoplast als solcher an diesen Vorgängen hat und wie weit sie durch die das Protoplasma einschließende Cellulosemembran, wenn auch nicht bedingt, so doch quantitativ verändert werden. Eine getrennte Untersuchung dieser beiden liegt derzeit nicht vor, da es aber nach den Versuchen über die Beinflussung der Aufnahme von Stoffen durch gelöste Kolloide unbedingt anzunehmen ist, daß eine zwischen Plasma und Außenlösung befindliche kolloide Membran die diosmotischen Eigenschaften der Zelle beeinflussen muß, so haben die Permeabilitätsverhältnisse der Membran sicher auch dann eine Bedeutung, wenn sie nicht durch Kutinisierung usw. undurchlässig gemacht wurde. Welcher Art aber diese ist, läßt sich nicht entscheiden, da der Einfluß der Membran als konstanter Faktor nicht zur Beobachtung gelangen kann. Man könnte annehmen, daß die Unterschiede, die sich z. B. zwischen Elodea und Spirogyra in bezug auf die Salzkonzentrationen, die eben hinreichen, damit entweder die maximale Farbstoffmenge in der Zelle gespeichert werden kann, oder die gerade die weitere Farbstoffaufnahme hemmen, herausgestellt haben, wesentlich durch die Unterschiede in der Dicke ihrer Zellmembranen bedingt seien; da es aber nicht möglich ist, isolierte Protoplasten beider Pflanzen zu vergleichen, so läßt sich der Beweis, daß dies nicht etwa durch spezifische Eigenschaften ihrer Protoplasten bedingt sei, nicht erbringen.

Die Auffassung von Szücs über diese Vorgänge wurde bereits auseinandergesetzt. Er führt mit Glück die Vorstellung ein, daß die Änderung des diosmierenden Farbstoffs durch Neutralsalze bzw. Alkali weitgehende Geschwindigkeitähnlichkeiten mit den Erscheinungen der von Perrin studierten Elektroendosmose hatten. Dieser hat nachgewiesen, daß, wenn eine elektrische Potentialdifferenz an ein System geschaltet wird, das durch ein Diaphragma in die beiden Teile a und b getrennt wird, die von a nach b durch den Strom überführte Wasser-

menge abnimmt, wenn das Diaphragma entladen bzw. umgeladen wird. Allerdings hat Höber in seiner Physikalischen Chemie der Zelle und der Gewebe richtig bemerkt, daß bei der Zelle von dem Vorhandensein von Strömen, die stark genug wären, um eine Elektroendosmose zu bewirken, keine Rede sein könnte. Dennoch scheint diese Deutung am besten mit den vorhandenen Tatsachen übereinzustimmen, da sie wohl überall Geltung haben dürfte, wo es sich um den Transport elektrisch geladener Massenteilchen durch eine ebenfalls elektrisch geladene Membran handelt. Welche Kraft dabei wirksam ist, im vorliegenden Falle ist es die Energie, die durch das Diffusionsgefälle Zellsaft-Außenlösung geliefert wird, dürfte wohl weitgehend ohne Bedeutung sein. Diese Untersuchungen, die unabhängig von der Szücsschen Arbeit angestellt wurden, haben Ergebnisse gezeitigt, die diese Auffassung des Protoplasmas in mancher Richtung stützen können.

Untersuchungen, die sich in bezug auf ihre Ergebnisse direkt mit den vorliegenden vergleichen lassen und dadurch Schlüsse auf die Aufladungsverhältnisse des Protoplasmas zulassen, sind die Resultate der Höberschen[1]) Arbeit über die Beeinflussung des Muskelruhestroms durch Salze. Er fand, daß die Stärke des Muskelruhestroms eine additive Funktion der einzelnen Ionen sei. Die Stärke des Muskelstroms nimmt zu durch die Wirkung der Kationen, dagegen nimmt er durch die Einwirkung der Anionen ab. Die Kationen verstärken in der Reihenfolge:

$$Li < Na < Mg < Cs < NH_4 < Rb < Ca,$$

während die einzelnen Anionen in der Reihenfolge:

$$Tartrat < HPO_n < Acetat < Chlorid < Bromid < Jodid < Nitrat < Rhodanat$$

seine Stärke herabsetzen. Die erste Reihe entspricht annähernd der, die für die Förderung der Exosmose des Farbstoffes aus der Zelle erhalten wurde. Die Reihe der Anionen wurde in entgegengesetzter Reihenfolge ebenfalls bei derselben Erscheinung wiedergefunden. Nur das Rhodanat nahm dort eine abweichende Haltung ein, doch wurde bereits auseinandergesetzt, daß das Rhodanat mit dem zugesetzten Farbstoff reagiert.

[1]) Höber, Arch. f. d. ges. Physiol. 106, 10, 11, 12, 1904, 593.

Es kann daher sein Verhalten nicht als ein wesentlicher Unterschied aufgefaßt werden. Die einzelnen Ionen können den Protoplasten um so stärker aufladen, je stärker positiv bzw. negativ sie sind.

Bei den berichteten Versuchen wurde gefunden, daß die Farbstoffaufnahme durch Zusatz von Neutralsalzen zuerst gefördert wird, dann geht bei einer weiteren Steigerung der zugesetzten Neutralsalzmenge die aufgenommene Farbstoffmenge wieder zurück, bis schließlich der Farbstoffdurchtritt durch den Protoplasten völlig aufhört. Die Exosmose des Farbstoffes dagegen wird durch zugesetzte Salze in dem untersuchten Konzentrationsgebiet stark gefördert, nur gewisse Salze, wie das Na-Citrat und -Tartrat und namentlich auch die Al-Salze, fördern nur in ganz niedrigen Konzentrationen den Austritt des Farbstoffes sehr stark, während sie ihn bei höherer Konzentration fast völlig hemmen. Man kann, wie bereits erwähnt, die Förderung der Exosmose durch Salze mit der Förderung der Endosmose vergleichen. Die vollständige Hemmung des Farbstoffdurchtrittes durch den Protoplasten tritt in beiden Fällen dann ein, wenn der ursprünglich elektronegative Protoplast durch das Kation des zugesetzten Salzes elektropositiv aufgeladen wurde. Wie ein Farbstoffanion den elektronegativen Protoplasten nicht oder nur in geringem Maße passieren kann, so kann auch jetzt das Farbstoffkation den elektropositiven Protoplasten nicht durchdringen. Der Farbstoff wird entweder nicht in die lebende Zelle aufgenommen, oder die Niederschläge bleiben intakt liegen, wenn sie zu Beginn des Versuches bereits in der Zelle vorhanden waren. Daß gerade Na-Citrat und -Tartrat einerseits und Al-Salze andererseits diejenigen Salze sind, die den Austritt des Farbstoffes aus der Zelle so stark hemmen, scheint in der Natur dieser Salze begründet. Das 3wertige Al-Ion ist sehr stark positiv geladen, im Na-Tartrat bzw. -Citrat ist ein schwach negatives Anion an ein stark positives Kation gekettet. Nach Höber schwächt das Tartrat den Muskelstrom nur ganz wenig. Es kann demnach die Wirkung des Na voll zur Geltung kommen. Demgegenüber kann als Beispiel das Na-Nitrat dienen, bei dem die Wirkung von Kation und Anion annähernd kompensiert wird und demnach nur eine geringe Förderung der Farbstoffexosmose vorhanden ist.

Dennoch befinden sich zwischen den Versuchen, die die Exosmose und die Endosmose betreffen, Abweichungen namentlich quantitativer Natur, die einer weiteren Aufklärung bedürfen. Besonders bei neutraler Reaktion der Außenlösung genügen bereits ganz geringe Mengen von Neutralelektrolyten, um die Farbstoffaufnahme vollends zu hemmen, während nur stark positive Kationen in dem physiologisch verwendbaren Konzentrationsbereich eine Hemmung an Farbstoffexosmose hervorbringen können. Die Tatsache legt die Annahme nahe, daß die Oberfläche Zellsaft-Plasma von der Oberfläche Plasma-Außenlösung verschiedene Eigenschaften haben muß. Da die erstere eine elektropositive Phase — der Zellsaft enthält ja in der Regel freie Säuren — gegen eine elektronegative abgrenzt, während die zweite in der Regel zwei elektronegative Phasen trennt, so erscheint diese Deutung nicht unwahrscheinlich. Es würde also die Diosmose eines Stoffes durch das Plasma auch von der Richtung des Durchtretens des betreffenden Stoffes abhängen.

Es fragt sich noch, wie die primäre Förderung der Speicherung des Farbstoffes zustande kommt. Bei steigender Adsorption des Kations des Salzes müßte ja eigentlich das Farbion immer mehr von der Plasmaoberfläche verdrängt werden und demnach die Farbstoffaufnahme kontinuierlich um so mehr abnehmen, je mehr Salz vorhanden ist. Vielleicht ist folgende Vorstellung imstande, diese Erscheinung verständlich zu machen. Wird der Farbstoff sehr fest von dem Protoplasma adsorbiert, so wird bei der Verteilung desselben zwischen Protoplasma und Zellsaft nur ein geringer Teil auf diesen entfallen. Ein Gleichnis dafür wäre mit einem Farbstoff gesättigte Kohle, die beim Schütteln mit Wasser diesen nicht oder nur sehr schwach färbt, wenn der Farbstoff an der Kohle sehr fest adsorbiert ist. Nur dadurch, daß gleichzeitig andere Ionen vorhanden sind, kann die Bindung an das Protoplasma gelöst werden und im Zellsaft größere Mengen Farbstoff aufgespeichert werden. Ähnlich verliert ja auch mit Neutralrot gefärbtes Filtrierpapier bedeutend mehr Farbstoff in salzhaltigem als in reinem destilliertem Wasser.

Sehr wichtig für die Deutung der vorliegenden Tatsachen erscheint die Wirkung der OH- und H-Ionen. Man kann wohl die letztere zusammenfassend erörtern, wenn man sich das

Protoplasma aus Stoffen bestehend denkt, die amphotere Elektrolyten sind. Bringt man OH-Ionen in Lösung, so wird die Dissoziation der OH-Ionen des Plasmas zurückgedrängt; das Plasma, das jetzt nur OH-Ionen abdissoziiert, ist negativ geladen. Umgekehrt hat der Protoplast in Gegenwart von H-Ionen eine positive Ladung. Wenn man nach und nach die Konzentration der zugefügten H-Ionen steigert, so wird man imstande sein, den isoelektrischen Punkt des Protoplasmas aufzufinden. Dieser ist nach Michaelis[1]) dadurch bestimmt, daß das Verhältnis der Dissoziationskonstanten des untersuchten Amphoterelektrolyten dasselbe ist wie das Verhältnis der OH- und H-Konzentrationen der Lösung. Nun fördern aber bei neutraler und alkalischer Reaktion im allgemeinen die Salze die Exosmose um so stärker, je höher ihre Konzentration ist. Die Reihe der Kationen, nach der diese Förderung erfolgt, ist folgende:

$$Na < K < Ca < Mg < Ba < Al,$$

die der Anionen:

$$\text{Nitrat} < \text{Nitrit} < \text{Chlorid} < \text{Sulfat} < \text{Rhodanat} < \text{Tartrat} < \text{Citrat}.$$

Je weiter nach rechts in dieser Reihenfolge ein Ion steht, um so stärker fördert es den Austritt des Farbstoffes. Die Sonderstellung des Tartrats und des Citrats und der Al-Salze wurde bereits auseinandergesetzt. Diese beiden Charakteristika können demnach als typisch für das elektronegative Plasma angesehen werden. Fügt man nun H-Ionen in steigender Menge zu, so findet sich bei $^{n}/_{12800}$-Oxalsäure noch das typische Verhalten des elektronegativen Eiweißes. Bei der doppelten Konzentration der Säure jedoch hat sich der Gang der Exosmose des Farbstoffions geändert. Der Farbstoff tritt nur bei einem niederen Salzgehalte der Lösung aus der Zelle, während mit dem Steigen der Konzentration des Neutralsalzes die Farbstoffexosmose immer mehr abnimmt und schließlich völlig sistiert wird. Außerdem kann man bei dieser Säurekonzentration auch eine ausgesprochene Umkehrung der Reihe der einzelnen Anionen bemerken; die Reihe der Kationen ist erst bei $^{1}/_{3200}$ Oxalsäure in entgegengesetzter Richtung zu beobachten,

[1]) Leonor Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. 33; siehe auch die übrigen Arbeiten dieses Autors über dieses Thema in verschiedenen Bänden dieser Zeitschrift.

obwohl sie auch bei $^1/_{6400}$ Säure nicht mehr dieselbe ist wie in $^1/_{12800}$ Säure. Diese auffallenden Veränderungen der diosmotischen Eigenschaften des Protoplasten lassen sich wohl nicht anders als durch eine Umladung des Protoplasten erklären. Bei $^1/_{6400}$ Oxalsäure findet man die Eigenschaften des elektropositiven Protoplasten, während er sich bei $^1/_{12800}$ Säure elektronegativ verhält. Es muß demnach zwischen diesen beiden Säurekonzentrationen der isoelektrische Punkt des Plasmas liegen. Da die Oxalsäure bei dieser Verdünnung als vollständig dissoziiert angesehen werden kann, so ergibt sich die H-Ionenkonzentration von $^2/_{6400}$-Oxalsäure mit $1{,}56 \cdot 10^{-4}$ n-H,[1]) von $^1/_{12800}$ Säure mit $0{,}78 \cdot 10^{-4}$ n-H.[1]) Zwischen diesen beiden Grenzen muß der isoelektrische Punkt des Protoplasmas liegen. Es wurde bei getöteten Zellen beobachtet, daß die Umkehrung der Anionenreihe und die typische Art der Förderung der Farbstoffexosmose, wie sie für das elektropositive Plasma charakteristisch ist, bereits bei $^1/_{12800}$ Säure zu beobachten ist. Es wäre danach anzunehmen, daß der isoelektrische Punkt des getöteten Protoplasmas tiefer liegt als der des nativen. Zwingend ist allerdings diese Deutung nicht, da der Einwand gemacht werden kann, daß die Exosmose nicht durch den Protoplasten sondern durch die bei der Denaturierung des Protoplasten durch einen Dampfstrahl entstandenen Risse und Spalten erfolge. Doch scheint jene Erklärung die wahrscheinlichere zu sein, da sich bei der Vergleichung der an lebenden und toten Zellen sich ergebenden Resultate viele Analogien zeigen, daß diese wohl unter jener Annahme, nicht aber unter dieser verstanden werden können. Jedenfalls ist die Frage noch nicht endgültig erledigt.

Es ist demnach in der Beobachtung der Beeinflussung der Exosmose von Farbstoffen aus der Zelle durch Salze bei Gegenwart steigender Mengen von Säure ein Mittel gegeben, den isoelektrischen Punkt des Protoplasmas auch an Pflanzen bzw. Zellen zu bestimmen die für kataphoretische Untersuchung nicht zugänglich sind. Michaelis[2]) hat es versucht, den isoelektrischen Punkt des Stromas der Blutkörperchen ver-

[1]) Es sei nochmals ausdrücklich betont, daß diese Zahlen keine endgiltig festgestellte Konstante darstellen sollen.

[2]) Michaelis und Dengo Takahashi, diese Zeitschr. 29, 439, 1910.

schiedener Tiere festzustellen. Einerseits aus der Beobachtung des Koagulationsoptimums der Stromasubstanz, das nach diesem Autor mit der Lage des isoelektrischen Punktes übereinstimmt, und dem Eintritte der Säurehämolyse andererseits, schloß er, daß der isoelektrische Punkt des Stromas des Blutkörperchen verschiedener Tiere bei $1{,}10^{-5}$ n-H liegen müsse. Nun gibt es aber bei der Pflanzenzelle eine Erscheinung, die vielleicht weitgehend mit der Hämolyse zu vergleichen ist. Es ist dies die von Czapek[1]) eingehend studierte Exosmose von Tannin, Zucker und Anthocyan aus der Zelle, die dann eintritt, wenn entweder die Oberflächenspannung der Außenlösung auf einen bestimmten Wert herabgesetzt ist oder wenn ihr Säure im Betrage von über $^1/_{6400}$ normal zugesetzt wurde. Da nun nachgewiesen wurde, daß diese Änderung der diosmotischen Eigenschaften des Protoplasmas durch Säure vor allem auf die Umladung desselben durch Säurezusatz beruht, so wird man auch diese Erscheinung zu einer Bestimmung des isoelektrischen Punktes auswerten können.

Allerdings sind die Werte, die man durch diese Methoden erhält, nicht so klar definiert als die, die man bei der Beobachtung eines beliebigen reinen Stoffes bekommt, worauf auch bereits Michaelis hinwies. Die erhaltenen Konstanten können auch aus dem Grunde nur den Wert einer Bruttokonstante beanspruchen, da sie, wie bereits auseinandergesetzt wurde, für verschiedene Schichten des Protoplasmas und die darin enthaltenen Plastiden wohl verschiedene sein müssen.

Daß die Umladung des Protoplasten vielfach mit dem Weiterleben desselben unvereinbar ist, zeigen die Untersuchungen von Kahlenberg und True[2]) und seines Schülers F. D. Heald[3]) über die Einwirkung von Säuren auf das Wachstum der Wurzeln verschiedener Pflanzen. Allerdings scheint nicht die Umladung des Protoplasten als solche den Tod der Zelle zu bedingen, sondern durch die dann erfolgende Exosmose verschiedener Stoffe dürfte ein Weiterleben der Zelle nicht möglich sein. Es dürfte jedoch Organismen geben, deren Protoplasma

[1]) Czapek, Über eine Methode zur Bestimmung der Oberflächenspannung lebender Zellen. Jena 1910.

[2]) Kahlenberg und True, Bot. Gaz. Chicago 22, 125, 1896.

[3]) F. D. Heald, Bot. Gaz. Chicago 22, 1896.

weitgehend umladbar ist. Dahin dürften wohl Pilze, Euglenen usw. gehören, die in basischer wie in saurer Lösung gedeihen können. Doch auch hier dürfte der Ladungscharakter von großer Bedeutung für die Art der Vollziehung verschiedener Lebensprozesse sein.

Zusammenfassung der Resultate.

1. OH-Ionen vermehren sowohl die aus der Zelle austretende Menge eines basischen Farbstoffes wie auch die eintretende, doch erfolgt bei einer gewissen höheren Konzentration von OH-Ionen eine Hemmung des Farbstoffeintrittes. KOH und NH_3 verhalten sich nur in den niedrigsten Konzentrationen der vorhandenen OH-Ionenmenge entsprechend gleich, später kommen Spezialwirkungen in Betracht.

2. H-Ionen hemmen den Eintritt des Farbstoffes in die Zelle.

3. OH-Ionen kompensieren den hemmenden Einfluß der Neutralsalze auf die Farbstoffspeicherung, ihre Optimalkonzentration ist abhängig von der Konzentration des vorhandenen Neutralsalzes.

4. Bei Säurezusatz beeinflussen Neutralsalze den Farbstoffaustritt bis zu einem Gehalt an $^1/_{12800}$ Säure nach den in der vorigen Abhandlung[1]) mitgeteilten Regeln. Von $^1/_{6400}$ Säure jedoch hemmen sie zunächst den Austritt des Farbstoffes, erst bei einem bestimmten höheren Salzgehalt vermehrt sich wieder die austretende Farbstoffmenge.

5. Bei $^1/_{6400}$ Säure erfolgt eine Umkehrung der Anionenreihe, die Umkehrung der Kationenreihe ist bei $^1/_{6400}$ wohl schon angedeutet, vollkommen deutlich aber erst in $^1/_{3200}$ Säure. Auf Grund dieser Tatsache wird die Lage des isoelektrischen Punktes des Plasmas von Elodea abgeleitet. Er liegt zwischen den H-Ionenkonzentrationen $1{,}56 \cdot 10^{-4}$ n und $0{,}78 \cdot 10^{-4}$ n. (Der von Michaelis für das Stroma der Blutkörperchen ermittelte Wert beträgt $1{,}10^{-5}$ n-H.)

6. Die toten Zellen lassen den Farbstoff nach denselben Regeln aus der Zelle austreten, doch tritt bei diesen auch in neutralen und alkalischen Versuchen das Tannin aus der Zelle heraus, es erfolgt aber der Austritt des Tannins langsamer als

[1]) J. Endler, diese Zeitschr. 42, 439.

der des Farbstoffes. In $^1/_{12800}$ Säure ist bereits die Umkehrung der Anionenreihe zu erkennen, daraus wird gefolgert, daß der isoelektrische Punkt des denaturierten Plasmas tiefer liegen muß als der des nativen.

7. Die Reversibilität der Salzeinwirkung hängt von der Dauer der Einwirkung ab. Die einzelnen Anionen bewirken ihr Irreversibelwerden in der Reihenfolge

Nitrat > Chlorid > Sulfat > Citrat > Tartrat.

8. Die in die Zelle eindringende Neutralrotmenge wird bei Vergleich des Carbonat, Acetat und Chlorhydrat dieses Farbstoffes charakteristisch durch OH-Ionen geändert.

9. Saure Farbstoffe dringen in der Regel nicht in die lebende Zelle ein, ist dies aber der Fall, so wird der Durchtritt des Farbstoffanions durch Säure gefördert, durch Alkali gehemmt.

10. Amphoterelektrolyten unter den Farbstoffen werden sowohl durch Alkali wie durch Säure beim Eintritte in die Zelle gefördert.

11. Die Farbstoffaufnahme in die Zelle wird im allgemeinen durch erhöhte Temperatur gefördert, doch hängt der Wert der Optimaltemperatur von dem Gehalte an Lösung an OH- und H-Ionen und Salzen ab.

12. Verschiedene Zucker hemmen die Farbstoffeinwirkung bei Erreichung einer bestimmten Konzentration. Diese Hemmung kann durch Alkalizusatz wieder aufgehoben werden. Ihre Reihenfolge ist Fructose bei 0,8 n, Milchzucker bei 0,6 n, Glucose bei 0,4 n.

13. Asparagin und Harnstoff vermögen den Farbstoffeintritt zu hemmen.

14. Die Aufnahme von Farbstoffen wird durch Zusatz verschiedener Alkohole nicht beeinflußt, solange der speichernde Stoff noch in der Zelle vorhanden ist. Wird der Farbstoff in Fetttröpfchen gespeichert, so ändert sich die hemmende Wirkung der Salze durch Alkoholgegenwart nicht.

15. Kolloide setzen durch Adsorption die Konzentration des Farbstoffes in der Außenlösung herab und verzögern dadurch die Farbstoffaufnahme, der Farbstoffaustritt dagegen wird durch sie beschleunigt.

Die Wirkung der Narkotica auf die Plasmaströmung.

Von

Helene Nothmann-Zuckerkandl.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 21. Juli 1912.)

Mit 4 Figuren im Text.

1. Einleitung.

Durch die Versuche von Czapek[1]) wurde gezeigt, daß die Wirkung der Alkohole, Ester, Ketone und anderer oberflächenaktiver Stoffe vorwiegend durch ihre capillaren Eigenschaften bedingt ist, unabhängig von der chemischen Konstitution. Denn Czapek fand, daß alle diese Stoffe in isocapillaren Lösungen die Exosmose der Zellsaftbestandteile hervorzurufen beginnen. Dieselbe Gesetzmäßigkeit hat dann Kisch[2]) für die Exosmose von Invertin aus Hefezellen festgestellt.

Der Anregung Prof. Czapeks folgend, habe ich die Hemmung der Plasmaströmung durch Narkotica untersucht, um zunächst die Frage zu beantworten, welche Bedeutung der Capillarität hier zukommt.

Es sind bereits wiederholt Versuche gemacht worden, die narkotische Wirkung von Stoffen verschiedener chemischer Konstitution auf gleiche physikalische Eigenschaften derselben zurückzuführen. Dies geschah durch Meyer[3]) und Overton[4]),

---

[1]) Friedrich Czapek, Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. Jena 1911.

[2]) Bruno Kisch, Über die Oberflächenspannung der lebenden Plasmahaut bei Hefe und Schimmelpilzen. Diese Zeitschr. **40**, 152, 1912.

[3]) H. H. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **42**, 109, 1899.

[4]) E. Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

die einen Parallelismus zwischen dem Teilungsquotienten für Fett und Wasser und der narkotischen Wirkung vieler Stoffe aufgefunden haben, ferner durch Traube[1]), der auf Grund der Erfahrung, daß narkotische Wirkung und Oberflächenaktivität in den homologen Reihen vieler Stoffe in gleicher Weise, nämlich mit dem Faktor 3 ansteigen, der Oberflächenaktivität eine wichtige Rolle bei der Narkose zuschrieb. Diese Annahmen fußen darauf, daß die Narkose als ein physikalischer Vorgang in der Plasmahaut anzusehen ist. Doch Abweichungen von den genannten Gesetzen, die man bei vielen Stoffen beobachtet hat, und auch manche andere Erwägungen weisen darauf hin, daß die Narkose erst durch eine Reaktion der Narkotica mit dem Polioplasma der Zelle zustande kommt. Meyer[2]) erwähnt selbst, daß das Aceton dieselbe Wirksamkeit entfaltet wie Äthylalkohol, obwohl seinem Teilungsquotienten gemäß eine bedeutend stärkere zu erwarten wäre. Czapek[3]) unterscheidet drei Arten von Narkoticis, solche die stark oberflächenaktiv und in Wasser leicht löslich sind (Alkohol, Äthylurethan), ferner oberflächenaktive, die in Wasser wenig löslich sind (Chloroform), und drittens solche, die leicht löslich, aber wenig oberflächenaktiv sind (Chloralhydrat). Auch Chloroform wirkt schon in Lösungen narkotisch, die die Oberflächenspannung des Wassers nur wenig erniedrigen. Bei Chloroform und Chloralhydrat hängt also die Narkose nicht mit der Capillarität zusammen.

Die bei Giften ganz allgemeine Erscheinung, daß bei schwachen Lösungen der Lähmung eine Stimulation vorausgeht, findet sich auch bei den Narkoticis, und sie deutet darauf hin, daß man auch die Gegenreaktion der Zelle — diese äußert sich ja in einer Stimulation — berücksichtigen muß. Man hat es hier mit einem komplizierten Vorgang zu tun, den man wohl auch bei oberflächenaktiven Stoffen nicht allein als eine Wirkung der Capillarität bezeichnen kann.

Überhaupt werden ja unter dem Begriff Narkose die verschiedenartigsten Erscheinungen zusammengefaßt. Ursprünglich war er nur für eine Lähmung der Nervenzellen bei Wirbel-

---

[1]) J. Traube, Verhdl. d. deutsch. phys. Ges. 1904, 326.

[2]) H. H. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 46, 338, 1901.

[3]) Czapek, l. c. S. 47 f.

tieren in Gebrauch, und hier ist das Aufhören der Reflexerregbarkeit das charakteristische Symptom. Bei Organismen, denen Reflexapparate fehlen, gibt es keine Narkose in diesem Sinne, doch bezeichnet man damit ganz allgemein reversible Lähmungserscheinungen bei Tieren und Pflanzen, so die Hemmung der Flimmerbewegung, der Plasmaströmung, der Reizbewegungen von Mimosa und Drosera u. a.

Die Plasmaströmung erwies sich insofern als geeignet für meine Versuche als man hier mit wässerigen Lösungen arbeiten kann, während man bei Mimosa und anderen reizbaren Pflanzen die Stoffe in Dampfform anwenden muß. Auch ließen sich leicht mit geringen Flüssigkeitsmengen viele Versuche nebeneinander aufstellen und eine große Anzahl von Zellen gleichzeitig mikroskopisch beobachten.

Zu den ersten orientierenden Versuchen verwendete ich verschiedenartige Objekte, Blätter von Elodea canadensis, Blatt- und Internodienzellen einer Nitella, Wurzelhaare von Tradescantia virginica, Blatt- und Stengelhaare von Cucurbita Pepo. Die beiden letzten Objekte sind insofern weniger geeignet, als wegen der Dicke der Cuticula die Stoffe langsam eindringen, die Zellen also anscheinend weniger empfindlich sind. Bei Tradescantia rief 11 % Methylalkohol erst nach vielen Stunden Lähmung hervor, während er bei Vallisneria, Elodea und Nitella sofortigen Stillstand erzeugt. Auch sind Luftorgane, wie die Haare von Cucurbita und Tradescantia, weniger brauchbar, weil für sie das flüssige Medium an sich schon eine Änderung der gewohnten Lebensbedingungen bedeutet. Die meisten Versuche wurden mit Vallisneria spiralis ausgeführt, da mir diese Pflanze stets in kräftigen Exemplaren zur Verfügung stand und ich hier die geringsten individuellen Schwankungen beobachtete. Es wurden Blattschnitte hergestellt und abgewartet bis sich lebhafte Strömung eingestellt hatte, was etwa nach einer halben Stunde der Fall war. Ich verwendete nur ältere Blätter, weil sie eine kräftigere Strömung zeigen und diese bei ihnen länger anhält als in jüngeren Blättern[1]).

Die hemmende Wirkung chemischer Agenzien auf die Plasmaströmung ist schon vielfach untersucht worden. Die meisten Angaben beziehen sich auf Gase. Ich verweise auf Kühne[2]), der die Hemmung der Plasmaströmung in den Staubfadenhaaren von Tradescantia virginica durch Kohlensäure und Wasserstoff studierte, auf die Arbeit von

[1]) P. Kretzschmar, Jahrb. f. wiss. Bot. 39, 295, 1904, gibt an, daß in jüngeren Pflanzen die Strömung viel schneller aufhört, während sie in älteren oft bis zum Tode der Zellen andauert.

[2]) W. Kühne, Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. Leipzig 1864, S. 108f.

Lopriore[1]), woselbst sich eine Übersicht der älteren Literatur befindet, auf die Arbeit von Farmer und Waller[2]), in der die Wirkung von Kohlensäure und von Äther und Chloroformdämpfen auf Elodea behandelt ist. Die Wirkung verschiedener Gifte auf die Protoplasmaströmung hat schon Dutrochet[3]) untersucht; er fand, daß Ätzkali, Weinsteinsäure, Opium, Alkohol in verdünnten Lösungen zunächst einen wenige Minuten anhaltenden Stillstand erzeugen, daß die Strömung sich wieder einstellt und dann auch bei andauernder Einwirkung des Giftes erst mit dem Tode der betreffenden Pflanzenteile erlischt. Auch die hemmende Wirkung des Ammoniaks war ihm bereits bekannt[4]). Hauptfleisch[5]) erwähnt, daß Antipyrin und Chloroform die Rotation in Elodeazellen zum Stillstand bringen, daß andererseits durch verdünnte Chloroformlösung (10 bis 15 % des gesättigten Chloroformwassers) in Sprossen von Elodea canadensis Strömung hervorgerufen werden kann. Josing[6]) fand, daß in verdünntem Äther und Chloroformlösungen die Strömung im Dunkeln zum Stillstand kommt, während unter normalen Verhältnissen Verdunkelung nur eine unbedeutende Verlangsamung herbeiführt. Er gibt ferner an, daß Ammoncarbonat, Alkohol, Strychnin, Cocain keinen Einfluß auf die Lichtreaktion haben. Klemm[7]) fand, daß Säuren, starke Alkalien, Metallsalze, Phenol raschen Stillstand bewirken, während Wasserstoffsuperoxyd und einige Anilinfarbstoffe die Strömung nicht behindern.

2. Allgemeiner Verlauf narkotischer Wirkungen auf die Plasmaströmung.

I. Versuche mit Alkoholen.

Die Lösungen wurden in Gläschen mit eingeriebenem Stöpsel von 50 oder 100 ccm eingefüllt und in diese die Pflanzenteile eingelegt. Die Gläschen wurden im Dunkeln, d. h. in einem verschlossenen Schrank aufbewahrt und nur von Zeit zu Zeit zur mikroskopischen Betrachtung herausgenommen. War Stillstand eingetreten, so wurden die Objekte in Wasser gelegt und nachgesehen, ob die Strömung wiederkehrte. Die Verdünnungen wurden in Volumenprozenten hergestellt, die Flüssigkeiten zu diesem Zwecke mit einer Bürette oder Pipette

---

1) Lopriore, Jahrb. f. wiss. Bot. 28, 530, 1895.

2) J. B. Farmer und A. D. Waller, Bot. Centralbl. 74, 377, 1898.

3) Hofmeister, Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig 1867, S. 53.

4) Pfeffer, Pflanzenphysiologie 2, 798, 1904. Weitere Literaturangaben S. 795 ff.

5) P. Hauptfleisch, Jahrb. f. wiss. Bot. 24, 220 f., 1892.

6) E. Josing, Jahrb. f. wiss. Bot. 36, 200, 1901.

7) P. Klemm, Jahrb. f. wiss. Bot. 28, 627, 1895.

abgemessen und in einem 50 oder 100 ccm-Meßkölbchen mit Wasser verdünnt. Meist wurde auch eine Dichtebestimmung ausgeführt. Nur bei Substanzen, von denen mir hierzu keine genügende Menge zur Verfügung stand, habe ich die Zahlen den Tabellen von Landolt-Börnstein oder von Beilstein entnommen.

Zunächst wurden die minimalen Konzentrationen festgestellt, die nach einer Stunde die Strömung zum Stillstand bringen. Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß die einzelnen Objekte ein verschiedenes Verhalten zeigen.

Tabelle I.

Alkohol	Vallisneria %	Trianea %	Nitella %	Elodea %
Methyl-	10	9	9	—
Äthyl-	9	8	9	—
n-Propyl- . . .	4	4	5	4
i-Butyl-	2,5	2	3	2,5
i-Amyl-	1	0,8	1,1	1

Eine Übereinstimmung bezüglich der Capillarität ergab sich nicht, wie aus den in Tabelle Ia angegebenen Werten hervorgeht.

Tabelle Ia.

Alkohol	Volumenprozent	Oberflächenspannung
Methyl-	10	0,7905
do.	9	0,8164
Äthyl-	9	0,704*
do.	8	0,724*
n-Propyl-	5	0,6219
do.	4	0,6632
i-Butyl-	3	0,6383
do.	2,5	0,6529
do.	2	0,6948
i-Amyl-	1,1	0,5676
do.	1	0,5835
do.	0,8	0,6172

Die mit * bezeichneten Zahlen sind der Arbeit von Czapek entnommen, die anderen habe ich selbst bestimmt.

Im Wasser trat Erholung ein, meist nach wenigen Stunden, in manchen Fällen erst nach einem halben Tage. Nur bei Trianea war dies nie der Fall, die Zellen waren schlaff ge-

worden und der Turgor stellte sich im Wasser nicht wieder her. Bei i-Amylalkohol war für alle untersuchten Objekte nach einstündiger Einwirkung nie Erholung zu konstatieren. Tabelle II enthält die Ergebnisse von Versuchen, in denen ich für Vallisneria die minimalen Konzentrationen feststellte, die nach einer Stunde irreversiblen Stillstand der Strömung erzeugen.

Tabelle II.

Alkohol	Volumenprozente
Methyl-	14
Äthyl-	12
n-Propyl-	7
i-Butyl-	4

Dieser Zustand muß noch nicht unbedingt mit dem Tode der Zellen zusammenfallen. Es könnte Erholung eintreten, ohne daß die Strömung wiederkehrt; diese müßte allerdings durch einen Reiz wieder hervorzurufen sein. Doch waren stets schon deutliche Schädigungen in den Zellen wahrnehmbar.

Für Vallisneria verfolgte ich dann genauer den Zusammenhang zwischen Konzentration und Zeit, denn jede Wirkung eines Stoffes stellt sich als eine Funktion dieser beiden Größen dar und man kann oberhalb eines gewissen Schwellenwertes mit schwächeren Konzentrationen denselben Effekt erzielen wie mit stärkeren Konzentrationen bei kurzer Versuchsdauer. Der Schwellenwert ist allerdings nicht so scharf zu bestimmen, wie dies etwa für die Exosmose möglich ist; denn dort hat man es mit einem viel einfacheren Vorgang zu tun, für den die physikalische Zustandsänderung der Plasmahaut das Entscheidende ist. Es wurde für jeden Alkohol der zeitliche Verlauf der Wirkung geprüft von der Konzentration an, die momentanen Stillstand herbeiführt, bis zu der, die auch nach drei Tagen ohne Einfluß auf die Strömung blieb[1]). Die Zeitbestimmungen für die höchsten Konzentrationen sind bis auf etwa eine Minute genau; Lösungen, die innerhalb weniger Stunden wirken, wurden jede $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde kontrolliert. Die weiteren

[1]) Schnitte, die in Wasser lagen, zeigten oft nach 4 bis 6 Tagen noch Strömung.

Daten sind ungenauer, schon deshalb, weil hier der Hemmung eine Zeit starker Verlangsamung vorangeht und sich dann für den Eintritt des Stillstandes große individuelle Schwankungen ergeben. Es lagen auch oft viele Stunden, mitunter lag auch eine Nacht zwischen zwei aufeinanderfolgenden Beobachtungen. Jede Versuchsreihe wurde zwei- bis dreimal aufgestellt, wenn sich große Unterschiede ergaben, auch öfter. In jede Lösung kamen stets mehrere Schnitte. Aus den erhaltenen Werten wurde dann das Mittel genommen. Für die einzelnen Konzentrationen habe ich die Oberflächenspannungen mit dem Czapekschen Capillarmanometer bestimmt. Die Zahlen wurden alle für die Temperatur von 15° umgerechnet nach der Formel $\sigma_t = \sigma_0 (1 - \gamma t)$, wobei $\gamma = 0{,}002$ gesetzt wurde. Zum Teil sind die Werte auch der Arbeit von Czapek entnommen; diese gelten für 16°.

Methylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 19° 0,79604. Die Temperatur betrug 20°. Die Wirkung war in allen Fällen reversibel.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
5	1,24	Keine Hemmung
6	1,49	165′
7	1,74	120′
8	1,99	105′
9	2,24	90′
10	2,48	15′
11	2,73	momentan

Äthylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 18° 0,79316. Die Temperatur betrug 18 bis 19°. Es trat in allen Fällen Erholung ein.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
4	0,69	Keine Hemmung
4,5	0,77	255′
5	0,86	240′
5,5	0,95	187′
6	1,03	135′
6,5	1,12	120′
7	1,22	105′
7,5	1,29	90′
8	1,38	60′
8,5	1,46	45′
9	1,55	45′
9,5	1,64	15′
10	1,72	momentan

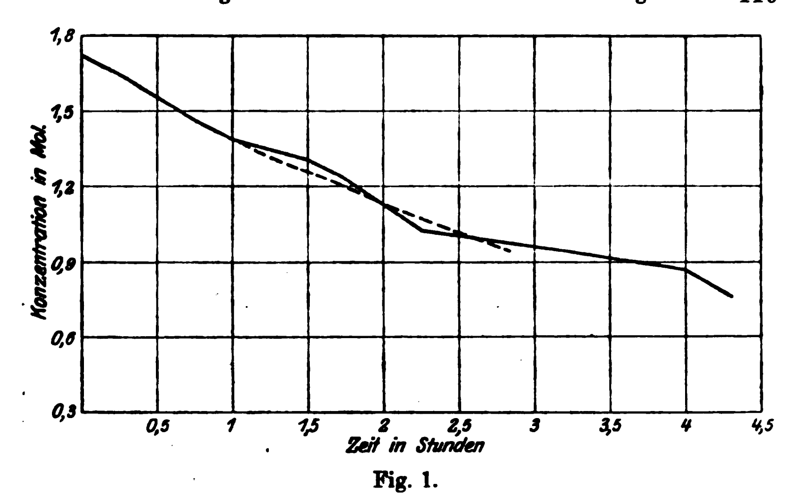


Fig. 1.

Berechnet man die beigefügte, aus den experimentell gefundenen Zeitwerten konstruierte Kurve (Fig. 1) nach dem Gesetze der Kurven unimolekularer Reaktionen, so erhält man beifolgende Werte, welche relativ wenig voneinander abweichen:

$$k = 2 \cdot 3026 \frac{1}{t} \log \frac{c_0}{c_t}.$$

$\log c_0 - \log c_t$	t	$k \cdot 105$
0,02228	15′	350
0,07058	45′	361
0,09691	60′	372
0,12494	90′	320
0,15490	105′	340
0,18709	120′	359
0,22185	135′	378
0,25964	187′	320
0,30103	240′	289
0,34679	255′	313

Der Mittelwert aus den ersten 8 Zahlen beträgt 350, die größte Abweichung davon ist 9°/₀. Die zwei letzten Werte blieben unberücksichtigt, weil die Zeitbestimmungen zu ungenaue waren. Es zeigt sich beim Äthylalkohol schon, was bei den höheren Gliedern noch mehr zum Ausdruck kommt, daß verdünnte Lösungen relativ schwächer wirken. Es tritt hier auch zunächst Stimulation auf, die erst allmählich in Hemmung übergeht.

Normal-Propylalkohol.

Präparat von Merck. Dichte bei 20° 0,8051. Die Temperatur betrug 20°. Die Wirkung war in den meisten Fällen reversibel. Verdünnte Lösungen wirkten erst nach langen Zeiträumen.

Volumen-prozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
1	0,13	Keine Hemmung
2	0,27	1440′
3	0,40	420′
4	0,54	45′
5	0,67	20′
6	0,81	momentan

Iso-Propylalkohol.

Präparat von Merck. Dichte bei 15° 0,7903. Die Temperatur betrug 21 bis 21½°. Die Hemmung war auch hier in den meisten Fällen reversibel. Die angeführten Zahlen lassen erkennen, daß dieser Alkohol schwächer wirkt als der isomere mit unverzweigter Kohlenstoffkette. 1 Mol führt momentanen Stillstand herbei, während vom normalen Propylalkohol nur 0,8 Mol dazu notwendig sind. 0,3 Mol sind hier unwirksam, während sie dort noch Stillstand hervorriefen.

Volumen-prozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
2	0,26	Keine Hemmung
3	0,39	24h
4	0,53	16h
5	0,66	160′
6	0,79	90′
7	0,92	20′
8	1,05	momentan

Normal-Butylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 16° 0,8018. Die Temperatur schwankte zwischen 16 und 19°. Die Strömung kehrte häufig nach eingetretener Hemmung nicht wieder, namentlich war dies bei den niederen

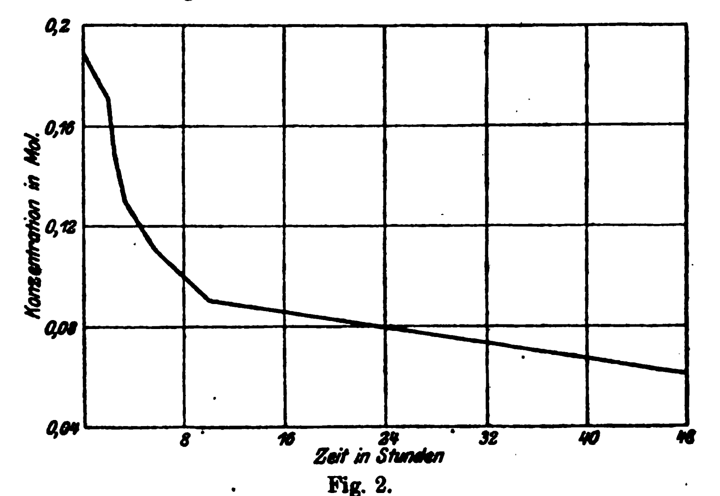


Fig. 2.

Konzentrationen zu bemerken, welche erst nach langer Zeit wirkten. Dasselbe gilt in verstärktem Maße von den nächsthöheren Homologen, die Narkosezone, d. h. das Gebiet der reversiblen Lähmung wird immer mehr eingeschränkt (Fig. 2).

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
0,4	0,04	Keine Hemmung
0,6	0,06	48h
0,8	0,09	540′
1,0	0,11	350′
1,2	0,13	195′
1,4	0,15	150′
1,6	0,17	120′
1,8	0,19	momentan

Iso-Butylalkohol.

Präparat von Merck. Dichte bei 21° 0,80509. Die Temperatur betrug 20°. 0,33 Mol ruft sofortige Hemmung hervor, während sie bei Normal-Butylalkohol schon bei 0,19 Mol eintritt. Die beiden Butylalkohole zeigen also dasselbe Verhalten wie die Propylalkohole. Den gleichen Unterschied zwischen isomeren Substanzen beobachteten Fühner und Neubauer[1]) bei der Hämolyse durch Alkohole, Loeb[2]) bei organischen Säuren bei seinen Versuchen mit Seeigeleiern und Vernon[3]) bei der Wirkung der Alkohole auf das Schildkrötenherz. Czapek[4]) fand, daß Iso-Propyl- und Iso-Butylalkohol die Oberflächenspannung des Wassers etwas weniger erniedrigen als die entsprechenden normalen Alkohole.

Volumenprozente	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
0,5	0,05	Keine Hemmung
1	0,11	480′
1,5	0,16	280′
2	0,22	145′
2,5	0,27	30′
3	0,33	momentan

Tertiär-Butylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 20° 0,7864. Die Temperatur schwankte zwischen 18 bis 22°. Momentaner Stillstand trat erst bei 0,85 Mol ein. Dieser Alkohol wirkt also merklich schwächer als die beiden primären Butylalkohole.

---

[1]) H. Fühner und E. Neubauer, Centralbl. f. Physiol., 20, Nr. 4, 1906.

[2]) J. Loeb, diese Zeitschr. 15, 254, 1909.

[3]) H. M. Vernon, Journ. of Physiol. 43, 325, 1911.

[4]) Czapek, l. c. S. 25f.

Volumen-prozente	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
0,8	0,08	Keine Hemmung
1	0,11	1500′
1,6	0,17	—
2	0,21	1380′
3	0,32	—
4	0,42	165′
5	0,53	60′
6	0,64	30′
7,5	0,80	20′
8	0,85	momentan

Iso-Amylalkohol.

Gewöhnliche Handelssorte. Dichte bei 19° 0,8115. Die Temperatur betrug 20 bis 21°. Es trat in den meisten Fällen keine Erholung ein.

Volumen-prozente	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
0,3	0,03	Keine Hemmung
0,4	0,04	12^h
0,5	0,05	—
0,6	0,05	—
0,7	0,06	6^h
0,8	0,07	6^h
0,9	0,08	4^h
1,0	0,09	3^h
1,1	0,10	35′
1,2	0,11	10′

Sekundärer Amylalkohol (Methylpropylcarbinol).

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 25° 0,8019. Die Temperatur betrug $20^1/_2$ bis $22^1/_2$°. Die Wirkung ist schwächer als die des primären Amylalkohols.

Volumen-prozente	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung still stand
0,4	0,04	Keine Hemmung
0,5	0,04	72^h
0,6	0,05	48^h
0,7	0,06	48^h
0,8	0,07	30^h
1,0	0,09	24^h
1,2	0,11	120′
1,4	0,13	20′
1,6	0,15	10′
1,8	0,16	5′

Tertiärer Amylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 25° 0,8049. Die Temperatur betrug 22 bis 23°. Die in der Tabelle angegebenen Werte lassen erkennen, daß dieser Alkohol schwächer wirkt als der sekundäre. Vernon[1]) hat gleichfalls gefunden, daß die tertiären Alkohole weniger wirksam

[1]) H. M. Vernon l. c.

sind als die sekundären und diese wieder weniger wirksam als die primären. Czapek[1]) beobachtete dasselbe bezüglich der Exosmose und er konnte zeigen, daß hier eine Parallele zwischen dem physiologischen Verhalten und der Oberflächenaktivität besteht. Die primären Alkohole erniedrigen die Tension des Wassers am meisten, die tertiären am wenigsten. Die Verschiedenheit der narkotischen Wirkung dürfte wohl auch durch dieses Verhalten zu erklären sein.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
0,6	0,05	Keine Hemmung
0,8	0,07	70^h
1	0,09	31^h
1,2	0,11	31^h
1,4	0,13	24^h
1,6	0,15	24^h
1,8	0,16	21^h
2	0,18	270′
2,5	0,23	82′
2,8	0,26	15′
3	0,27	5′

Heptylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 16° 0,830. Die Temperatur betrug 22 bis 23°. Dieser Alkohol ist in Wasser sehr wenig löslich. Ich stellte mir durch mehrtägiges Stehenlassen bei Zimmertemperatur und wiederholtes Schütteln eine gesättigte Lösung her. Es lösten sich annähernd 0,2 ccm in 100 ccm Wasser, was einer molaren Konzentration von 0,014 entspricht.

	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
Gesättigte Lösung	0,0143	momentan
1/2 d. gesätt. Lösung	0,0071	30′
1/4 „ „ „	0,0036	240′
1/8 „ „ „	0,0018	keine Hemmung

Ich stellte hier auch die Exosmosegrenze für Echeveria Scheideckerii fest mittels der Coffein-Gerbstoffüllung, die Czapek[2]) bei seinen Versuchen verwendete. Der Schwellenwert lag zwischen 1/2 und 1/4 der gesättigten Lösung die den Tensionswerten 0,58 und 0,70 entsprechen. Der von Czapek angegebene Wert 0,68 liegt zwischen diesen beiden Zahlen.

Oktylalkohol.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 22° 0,835. Die Temperatur schwankte zwischen 22 bis 25°. Dieser Alkohol ist ebenfalls sehr wenig wasserlöslich. Ich ging wieder von einer gesättigten Lösung aus. Es löste sich etwa 0,1 ccm in 200 ccm Wasser, was einer molaren Konzentration von 0,003 entspricht.

---

[1]) Czapek l. c. S. 32.

[2]) Czapek, l. c. S. 7ff., ferner über Fällungsreaktionen in lebenden Pflanzenzellen. Ber. d. bot. Ges. 1910, S. 147.

	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
Gesättigte Lösung	0,0032	momentan
1/2 d. gesätt. Lösung	0,0016	90′
1/4 " " "	0,0008	24h
1/8 " " "	0,0004	keine Hemmung

Es wurde ebenfalls die Exosmosegrenze bestimmt in derselben Weise wie beim Heptylalkohol. Sie lag zwischen 1/2 und 1/4 der gesättigten Lösung entsprechend den Tensionswerten 0,66 und 0,81.

Übersicht über die Versuche mit Alkoholen.

Um die Wirkung der einzelnen Alkohole miteinander zu vergleichen, habe ich in einigen Tabellen (Tab. III bis VI) die Werte zusammengestellt, die nach annähernd gleicher Zeit Stillstand hervorriefen. Auch die Zahlen für die Oberflächenspannung der betreffenden Lösungen sind beigefügt.

Tabelle III.
Stillstand der Strömung binnen wenigen Minuten.
Temperatur zwischen 16 und 25°.

Alkohol	Volumenprozent	Molare Konzentration	Oberflächenspannung
Methyl-	11	2,73	0,780*
Äthyl-	10	1,72	0,700*
n-Propyl-	6	0,81	0,5991
i-Propyl-	8	1,05	0,6115*
n-Butyl-	1,8	0,19	zwischen 0,66 und 0,62
i-Butyl-	3	0,33	0,6383
tertiär-Butyl- . . .	8	0,85	0,5184*
i-Amyl-	1,2	0,11	0,5507
sec-Amyl-	1,8	0,16	0,5546
tertiär-Amyl- . . .	3	0,27	0,5905
Heptyl-	gesättigte Lösung	0,014	0,5554
Oktyl-	gesättigte Lösung	0,003	0,5134

Die Giftigkeit der Alkohole nimmt mit steigendem Molekulargewicht zu, wie sich dies bei allen bisherigen Untersuchungen herausgestellt hat. Die Quotienten für diese Zunahme liegen, wie Tabelle VII zeigt, in vielen Fällen zwischen 2 und 3, entsprechen also ungefähr dem Traubeschen Gesetz. Eine ähnliche angenäherte Übereinstimmung fand Loeb[1]) für die Narkose bei Daphnien. Eine genaue Übereinstimmung ist auch nicht zu erwarten, denn das Traubesche Gesetz ist der Ausdruck der steigenden Oberflächenaktivität in der homologen

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 23, 93, 1909.

Tabelle IV.
Stillstand der Strömung innerhalb 1 bis 1 1/2 h.
Temperatur zwischen 16 und 25°.

Alkohol	Volumen-prozent	Molare Konzentration	Oberflächen-spannung
Methyl-	9	2,24	0,8164
Äthyl-	8	1,38	0,724*
n-Propyl-	4	0,54	0,6632
i-Propyl-	6	0,79	0,6384*
i-Butyl-	2,5	0,27	0,6529
tertiär-Butyl- . . .	5	0,53	0,5708
i-Amyl-	1,1	0,10	0,5676
sec-Amyl-	1,4	0,13	0,5726
tertiär-Amyl- . . .	2,6	0,24	0,6168
Heptyl-	1/2 d. gesätt. Lösung	0,0071	0,5781
Oktyl-	1/2 d. gesätt. Lösung	0,0016	0,6559

Tabelle V.
Stillstand der Strömung nach 3 bis 7h.
Temperatur zwischen 16 und 25°.

Alkohol	Volumen-prozent	Molare Konzentration	Oberflächen-spannung
Methyl-	6	1,49	0,8798
Äthyl-	4,5	0,77	> 0,782*
n-Propyl-	3	0,40	0,7045
i-Propyl-	5	0,66	0,6827*
n-Butyl-	1	0,11	0,7287
i-Butyl-	1,5	0,16	0,7471
tertiär-Butyl- . . .	4	0,42	0,6116*
i-Amyl-	0,8	0,07	0,6172
tertiär-Amyl- . . .	2	0,18	0,6532
Heptyl-	1/4 d. gesätt. Lösung	0,0036	0,7036

Reihe, darum gilt es für jene Vorgänge, die lediglich auf einer Tensionsänderung beruhen, wie die Hämolyse[1]) und die Exosmose[2]), nicht aber die Narkose, bei der noch andere Faktoren mitspielen und bei der wohl die chemischen Reaktionen, die in der Zelle hervorgerufen werden, das Wesentliche sind. Führer[3]) zeigte in seiner letzten Arbeit, daß das Traubesche Gesetz für die Narkose in vielen Fällen nicht stimmt, er fand nämlich für das Ansteigen der narkotischen Wirkung in der Alkoholreihe bei niederen Tieren den Quotienten 3, bei höheren Tieren stieg er jedoch bis auf 4.

[1]) H. Führer und E. Neubauer, l. c.
[2]) F. Czapek, l. c. — B. Kisch, l. c.
[3]) Führer, Zeitschr. f. Biol. 57, 465, 1912.

Tabelle VI.

Stillstand der Strömung nach 24^h.
Temperatur 16 bis 25°.

Alkohol	Volumenprozent	Molare Konzentration	Oberflächenspannung
Methyl	6	1,49	0,8798
Äthyl	4,5	0,77	> 0,782*
n-Propyl	2	0,27	0,7927*
i-Propyl	3	0,39	0,7422*
n-Butyl	0,8	0,09	zwischen 0,84 und 0,73
i-Butyl	1	0,11	0,7774
tertiär-Butyl	1	0,11	0,7941*
i-Amyl	0,4	0,04	0,7265*
sec-Amyl	1	0,09	0,6407
tertiär-Amyl	1,6	0,15	0,6896
Heptyl	1/4 d. gesätt. Lösung	0,0036	0,7036
Oktyl	1/4 d. gesätt. Lösung	0,0008	0,8067

Tabelle VII.

Quotienten für die Zunahme der Wirkung bei aufeinanderfolgenden homologen Alkoholen.

Zu Tabelle III.
Methyl-Aethyl 1,6
Äthyl-n-Propyl 2,1
n-Propyl-n-Butyl 4,2
i-Propyl-i-Butyl 3,1
i-Butyl-i-Amyl 3
tert.-Butyl-tert.-Amyl 3,1
i-Amyl-Heptyl 7,8 $\sqrt{7,8} = 2,8$
Heptyl-Oktyl 4

Zu Tabelle IV.
Methyl-Aethyl 1,6
Äthyl-Propyl 2,5
i-Propyl-i-Butyl 2,9
i-Butyl-i-Amyl 2,7
tert.-Butyl-tert.-Amyl 2,2
i-Amyl-Heptyl 14 $\sqrt{14} = 3,7$
Heptyl-Oktyl 4,4

Zu Tabelle V.
Methyl-Propyl 1,9
Äthyl-n-Propyl 1,9
n-Propyl-n-Butyl 3,6
i-Propyl-i-Butyl 4,1
i-Butyl-i-Amyl 2,3
tert.-Butyl-tert.-Amyl 2,3
i-Amyl-Heptyl 19 $\sqrt{19} = 4,3$

Zu Tabelle VI.
Methyl-Aethyl 1,9
Äthyl-n-Propyl 2,8
n-Propyl-n-Butyl 3
i-Propyl-i-Butil 3,5
i-Butyl-i-Amyl 2,7
i-Amyl-Heptyl 11 $\sqrt{11} = 3,3$
Heptyl-Oktyl 4,5

Die Werte für die Oberflächenspannung zeigen wenig Übereinstimmung. Im allgemeinen nähern sie sich für die Konzentrationen, die erst nach längerer Zeit wirken, dem Werte 0,68, der Tension des Wassers, den Czapek für die Exosmose und den Zelltod feststellte. Für Lösungen, die bei 24stündiger Einwirkung noch eine reversible Lähmung erzeugen, liegen sie alle oberhalb dieses Wertes, wie es ja zu erwarten war, so z. B. beim Methyl- und Äthylalkohol. In den Fällen, wo sie den kritischen Wert für die Exosmose er-

reichen oder unterhalb desselben liegen, war dagegen keine Erholung zu erzielen. Bei Konzentrationen, die nach wenigen Minuten bis zu solchen, die nach einigen Stunden wirken, lagen die Tensionswerte für die niedrigen Glieder der Reihe ebenfalls oberhalb 0,68 der Tension des Wassers, für die höheren Glieder jedoch lagen sie beträchtlich niedriger, so beim Butyl- und Amyl- und auch beim Propylalkohol. Daß hier nun in vielen Fällen — beim Propylalkhohol immer — Erholung eintrat, führe ich darauf zurück, daß diese Alkohole langsamer eindringen. Denn wenn sich das Gleichgewicht rasch einstellen würde, müßte infolge der Wirkung auf die Plasmahaut der Tod der Zelle eintreten. Schubert[1]) führt die geringere Giftigkeit, die er bei i-Amyl gegenüber Äthylalkohol beobachtete, ebenfalls auf langsameres Eindringen des ersteren zurück.

Beim Äthylalkohol sahen wir, daß die Kurve für Konzentration und Zeit den Kurven für den Verlauf unimolekularer Reaktionen gleicht. Bei den höheren Alkoholen war dies nicht mehr der Fall. Auch den Adsorptionsisothermen glichen die Kurven nicht, denn sie ergaben logarithmiert keine geraden Linien. Dieses Merkmal wird bekanntlich[2]) als ein Kriterium für einen Adsorptionsvorgang angesehen. Die Adsorption in der Plasmahaut, die wohl bei der Aufnahme der Alkohole in die Zelle eine wichtige Rolle spielt, kommt hier nicht rein zum Ausdruck, da noch andere Prozesse stattfinden müssen, ehe eine Hemmung der Plasmaströmung eintritt. Hingegen ließen sich bei den Ketonen, wie weiter unten gezeigt wird, die Kurven als Adsorptionsisothermen deuten.

II. Versuche mit Estern.

Methylacetat.

Präparat von Merck. Dichte bei 22° 0,92717. Die Temperatur lag bei 22 bis 26°.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
0,6	0,07	keine Hemmung
1	0,12	240′
2	0,25	60′
3	0,38	15′
4	0,50	momentan

Die Oberflächenspannung der 4%igen Lösung beträgt 0,7608*.

[1]) W. Schubert, Flora 100, 68, 1910.

[2]) H. Freundlich, Zeitschr. f. phys. Chem. 57, 391.

Äthylacetat.

Aus dem Prager Chemikalienhandel. Dichte bei 24° 0,89129. Die Temperatur lag zwischen 23 und 25°. Die Zahlen der Tabelle lassen erkennen, daß diese Substanz wirksamer ist als Methylacetat, der Quotient ist in diesem Falle kleiner als 2. Für einige Konzentrationen habe ich auch die Oberflächenspannungswerte beigefügt. Bei beiden Estern war die Hemmung meist reversibel.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand	Oberflächenspannung
0,3	0,03	keine Hemmung	—
0,6	0,06	24h	—
1	0,10	300′	0,8466*
2	0,20	65′	0,7350*
3	0,30	25′	0,6912*
4	0,40	momentan	0,6334*

Äthylurethan.

Präparat von Merck. Die Temperatur lag zwischen 23 und 25°. Ich stellte mir eine molare Lösung her und verdünnte sie dann nach Potenzen von 2. Die der folgenden Tabelle beigefügten Tensionswerte zeigen, daß auch wenig oberflächenaktive Lösungen noch eine beträchtliche Wirkung entfalten.

Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand	Oberflächenspannung
$^1/_{64}$	keine Hemmung	—
$^1/_{32}$	18h	—
$^1/_{16}$	12h	—
$^1/_8$	120′	0,9312*
$^1/_4$	10′	0,8546*
$^1/_2$	3′	0,7701*
$^1/_1$	momentan	0,6836*

III. Versuche mit Äthyläther.

Aus dem Prager Chemikalienhandel. Dichte bei 24° 0,71072. Ich stellte mir durch 24stündiges Stehenlassen und wiederholtes Schütteln eine gesättigte Lösung her, die ich nach Potenzen von 2 mit Wasser verdünnte. Eine gesättigte Lösung enthält bei 21° 6,49 Volumteile Äther in 100 Teilen Wasser. Die Temperatur während der Versuche lag zwischen 23 und 26°.

Die Strömung kehrte nach eingetretener Hemmung rasch wieder, wenn die Schnitte in Wasser gelegt wurden. Die Stimulation ist bei den verdünnteren Lösungen ziemlich stark ausgeprägt.

	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand	Oberflächenspannung
Gesättigte Lösung	0,62	momentan	0,5378*
$^1/_2$ d. ges. Lös.	0,31	25′	0,6116*
$^1/_4$ " " "	0,15	19h	0,7145*
$^1/_8$ " " "	0,08	19h	0,7825*
$^1/_{16}$ " " "	0,04	keine Hemmung	0,8446*

IV. Versuche mit Ketonen.

Aceton.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 19,5° 0,79396. Die Temperatur betrug 20 bis 22°. Nach den angeführten Werten wurde die logarithmierte Kurve ($\log c - \log {}^1/_t$-Kurve) gezeichnet und sie ergab eine annähernd gerade Linie, entsprach also dem Verhalten einer Adsorptionsisotherme. Die Oberflächenspannung einer 10 % igen Lösung beträgt 0,6790*, die einer 9 % igen 0,7045*.

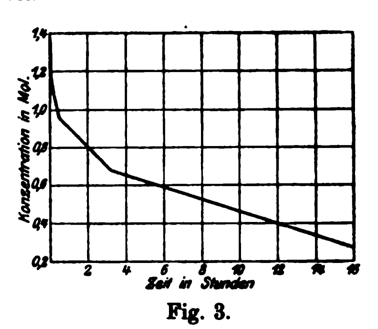


Fig. 3.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
2	0,27	keine Hemmung
3	0,41	16ʰ
4	0,55	200′
5	0,68	200′
6	0,82	30′
7	0,96	30′
8	1,09	15′
9	1,23	6′
10	1,37	momentan

Fig. 4.

Methyläthylketon.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 22,5° 0,80486. Die Temperatur lag zwischen 20,5 und 26°. Die Oberflächenspannung einer 3 % igen Lösung beträgt 0,7455*, die einer 4 % igen 0,7025*. Auch hier liefert die logarithmierte Kurve eine annähernd gerade Linie.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
0,4	0,04	keine Hemmung
0,6	0,07	24ʰ
1	0,11	120′
1,5	0,17	—
2	0,22	105′
2,5	0,28	60′
3	0,33	45′
3,5	0,39	20′
4	0,45	10′
4,5	0,50	momentan

Methylpropylketon.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 21° 0,805. Die Temperatur betrug 21 bis 22°. Auch hier war die logarithmierte Kurve von einer geraden Linie nur wenig verschieden.

Volumen-prozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand	Oberflächen-spannung
0,5	0,05	keine Hemmung	—
1	0,09	24h	0,7573*
1,5	0,14	180′	—
2	0,19	70′	0,6673*
2,5	0,23	15′	—
3	0,28	8′	0,5968*
4	0,37	momentan	0,5459*

Bei den Ketonen war die Hemmung der Strömung durch Übertragen in Wasser rasch rückgängig zu machen. Die Zunahme der narkotischen Wirkung entsprach nicht dem Traubeschen Gesetz, wie die folgenden Zahlen zeigen.

	Momentane Wirkung	Quotient
Aceton	1,37 Mol.	—
Methyläthylketon	0,50 „	2,5
Methylpropylketon . . .	0,37 „	1,3

V. Versuche mit Chloroform.

Die Temperatur schwankte zwischen 20 bis 23°. Ich ging von einer gesättigten Lösung aus, die ich mir durch wiederholtes Schütteln und mehrtägiges Stehenlassen herstellte. Ihre Oberflächenspannung beträgt 0,98, ist also von der des Wassers kaum verschieden.

Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
1/8 der gesättigten Lösung	momentan
1/10 „ „ „	24h
1/16 „ „ „	unwirksam

Es trat in Wasser rasch Erholung ein.

VI. Versuche mit Chloralhydrat.

Die Temperatur betrug 25 bis 26°. Den Ausgangspunkt bildete eine halbmolare Lösung. Die Oberflächenaktivität ist, wie die beigefügten Zahlen zeigen, eine sehr geringe. Die Strömung stellte sich in Wasser in vielen Fällen nicht wieder her.

Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand	Oberflächen-spannung
1/64	20h	—
1/32	360′	—
1/16	90′	0,9708*
1/8	10′	0,9514*
1/4	4′	0,8834*
1/2	momentan	0,8407*

VII. Versuche mit Aldehyden.

Acetaldehyd.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 21,3° 0,78754. Die wässerige Lösung reagierte schwach sauer; darauf ist wohl auch die starke Giftwirkung dieser Substanz zurückzuführen. Ein Teil der Zellen wurde auch bei kurzer Versuchsdauer meist getötet. In den lebenden Zellen stellte sich nach einigen Stunden die Strömung wieder her. Exosmoseversuche mit Echeveria Scheideckerii und Tradescantia viridis ergaben, daß der Grenzwert unter 1 % liegt. Die Oberflächenspannung dieser Lösung beträgt 0,9820, ist also von der des Wassers wenig verschieden. Hier bleibt eben die capillare Wirksamkeit neben anderen toxischen Eigenschaften zurück. Die Temperatur während der Versuche betrug 21 bis 23°.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
0,01	0,0018	keine Wirkung
0,05	0,0089	240′
0,1	0,0178	120′
0,2	0,0354	45′
0,5	0,0888	5′
1	0,1777	momentan

Propylaldehyd.

Präparat von Kahlbaum. Dichte bei 25° 0,79664. Die wässerige Lösung reagierte sauer. Diese Substanz ist ebenfalls stark giftig, selbst in einer Konzentration von 0,0001 Mol rief sie noch Hemmung hervor. Die Exosmosegrenze lag für Echeveria Scheideckerii zwischen 0,1 und 0,05 %. Die Oberflächenaktivität dieser Lösungen ist eine sehr geringe, für 0,1 % beträgt sie 0,9222. Die Hemmung war nie reversibel.

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
0,0005	0,0001	keine Wirkung
0,001	0,0001	16^h
0,005	0,0007	16^h
0,01	0,0014	6^h
0,05	0,0069	95′
0,1	0,0137	30′
0,2	0,0274	20′
0,4	0,0549	10′
0,6	0,0823	5′
0,8	0,1098	momentan

VIII. Versuche mit Säuren.

Kahlenberg und True[1]) haben die Hemmung des Wurzelwachstums durch Säuren bei Lupinenkeimlingen untersucht und fanden als Schwellenwert, bei dem eben keine Schädigung auftritt, die molare Konzentration von $^1/_{6400}$ sowohl bei allen

[1]) Kahlenberg und True, Botanical gazette 22, 81, 1896.

Mineralsäuren als auch bei vielen organischen Säuren. Sie sehen diese Übereinstimmung als Beweis dafür an, daß die Wasserstoffionenkonzentration allein bestimmend ist, und führen die geringere Giftigkeit einiger organischer Säuren auf die geringere elektrolytische Dissoziation zurück. Czapek[1]) fand als Schwellenwert für die Exosmose bei Mineralsäuren und einer Reihe von organischen Säuren ebenfalls den Wert $^m/_{6400}$ und ist ebenfalls der Ansicht, daß hier das Wasserstoffion für die Säurewirkung maßgebend ist. Nicht erklärt durch diese Annahme sei jedoch, daß die Essigsäure trotz ihrer geringen Dissoziation ebenso stark wirkt wie die stark dissoziierten Mineralsäuren. Czapek weist auf die Versuche von Loeb[2]) mit Fettsäuren hin, aus denen hervorgeht, daß sie eine relativ viel stärkere Wirksamkeit besitzen als die Mineralsäuren und daß ihre Giftigkeit mit der Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül stetig ansteigt, und er macht darauf aufmerksam, daß man dieses Verhalten mit der Zunahme der Oberflächenaktivität in der homologen Reihe in Zusammenhang bringen könnte. Erwähnen will ich auch noch, daß Paul, Birstein und Reuß[3]) angeben, daß die Desinfektionswirkung der Essigsäure und der normalen Buttersäure erheblich stärker ist als die der Salzsäure in isohydrischer Lösung.

Meine Säureversuche erstreckten sich auf Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, die einbasischen Fettsäuren und einige andere organische Säuren. Ich stellte fest, bei welcher Konzentration nach 24stündiger Einwirkung keine Hemmung der Plasmaströmung mehr eintrat. Die Hemmung war in allen Fällen nicht wieder rückgängig zu machen. Für die Mineralsäuren und einige organische Säuren fand ich in Übereinstimmung mit Kahlenberg und True und mit Czapek den Wert $^m/_{6400}$[4]) (Tabelle VIII). Bei den Fettsäuren[5]) fiel die Ameisensäure durch ihre größere Giftigkeit aus der Reihe. Die folgenden Glieder zeigten den Wert $^m/_{3200}$, erst von der Capronsäure an nahm die Wirksamkeit zu. Die Oberflächenaktivität aller dieser Lösungen ist sehr

[1]) Czapek, l. c., S. 74ff.

[2]) Loeb, diese Zeitschr. 15, 254, 1909; 23, 93, 1909.

[3]) Paul, Birstein und Reuß, diese Zeitschr. 29, 202.

[4]) $^m/_{6400}$ entspricht einer Wasserstoffionenkonzentration von etwa $\pm 1 \cdot 10^{-5}$.

[5]) Bei Ameisen- und Essigsäure stellte ich mir durch Titration eine $^m/_{100}$ Säure her. Bei den übrigen Gliedern ging ich von einer $^m/_{10}$ Lösung aus; die entsprechende Substanzmenge wurde in einem 100 ccm-Meßkölbchen eingewogen und Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle VIII.

		Fettsäuren	
Oxalsäure	$^m/_{6400}$	Ameisensäure	$^m/_{12800}$
Bernsteinsäure	$^m/_{3200}$	Essigsäure	$^m/_{3200}$
Milchsäure	$^m/_{6400}$	Propionsäure	$^m/_{3200}$
Weinsäure	$^m/_{6400}$	n-Buttersäure	$^m/_{3200}$
Citronensäure	$^m/_{6400}$	n-Valeriansäure	$^m/_{3200}$
Äpfelsäure	$^m/_{3200}$	i-Valeriansäure	$^m/_{3200}$
Fumarsäure	$^m/_{6400}$	n-Capronsäure	$^m/_{6400}$
Salicylsäure	$^m/_{12800}$	i-Capronsäure	$^m/_{6400}$
		Caprylsäure $^1/_2$ d. ges. Lösg. (ungefähr $^m/_{6400}$)	
		Nonylsäure $^1/_{32}$ d. ges. Lösg. (ges. Lösg. 0,1097 g in 600 ccm)	
		Caprinsäure $^1/_2$ d. ges. Lösg. (die ges. Lösg. enthielt nur Spuren von Säure)	

gering. Erst die Caprylsäure zeigte auch in einer stark verdünnten Lösung ($^m/_{2000}$) den Wert 0,65. Die entsprechenden Lösungen von Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure usw. zeigten eine Tension, die sich von der des Wassers kaum unterschied. Von Caprinsäure gingen nach mehrtägigem Stehenlassen und wiederholtem Schütteln nur Spuren in Lösung; die Tensionsbestimmung ergab den Wert 0,79. Trotz dieser geringen Unterschiede glaube ich doch, daß die erhöhte Giftigkeit der höheren Fettsäuren auf ihrer stärkeren Adsorbierbarkeit beruht. Die Oberflächenaktivität einer Lösung ist eben nicht immer ein Maß für die Adsorbierbarkeit des gelösten Stoffes. Bei manchen anderen Säuren ist dieses Moment wohl auch maßgebend. Ich führe hier einige Zahlen von Freundlich[1]) an, die sich auf die Adsorption durch Blutkohle beziehen.

Stoff	$\frac{x}{m}\left(\frac{\text{Milliäquivalent}}{\text{Gramm Kohle}}\right)$
Essigsäure	0,37
Propionsäure	0,57
Buttersäure	1,04
Salicylsäure	3,04
Benzoesäure	3,27
Bernsteinsäure	1,30

Die stärkste Adsorbierbarkeit zeigen in dieser Zusammenstellung Salicylsäure und Benzoesäure. Für Benzoesäure fand nun Loeb[2]) auch, daß sie wesentlich giftiger ist als Buttersäure. Salicylsäure war in meinen Versuchen ebenfalls giftiger als die meisten der anderen untersuchten Säuren.

Der Einfluß der Temperatur.

Die meisten Versuche wurden mit Äthylalkohol angestellt. Ich prüfte seine Wirkung bei 8°, wo sie erheblich geringer ist als bei Zimmertemperatur, und bei 28° und bei 38°, wo sie

[1]) H. Freundlich, Capillarchemie 1909, S. 160, Tab. XLIII.
[2]) Loeb, diese Zeitschr. 15, 254, 1909.

eine bedeutende Steigerung erfährt. Ich arbeitete hier und auch weiterhin nur mit Vallisneria.

Für die Versuche bei erhöhter Temperatur benutzte ich folgende Anordnung: Die Versuche wurden in einem Wasserbad gemacht, das durch eine Gasflamme geheizt und durch einen Quecksilberthermoregulator auf konstanter Temperatur erhalten wurde. Für gleichmäßige Erwärmung im Innern des Gefäßes war durch einen Glasrührer gesorgt, der mit einer Wasserturbine angetrieben wurde. Die Schnitte wurden in Röhrchen gelegt, die mit einem Stückchen Kautschukschlauch und einem Schraubenquetschhahn verschlossen wurden. Die Röhrchen waren in der Mitte flachgedrückt, um eine direkte mikroskopische Beobachtung zu gestatten. So wurde vermieden, daß sich die Temperatur in der Umgebung der Schnitte während des Herausnehmens aus dem Wasserbade allzu stark änderte. Die Röhrchen wurden durch Umwickeln mit Zinnfolie verdunkelt. Stets wurde ein Kontrollversuch mit Wasser gemacht. In den Versuchen bei 8° wurden die Röhrchen in fließendes Leitungswasser gelegt, dessen Temperatur ich durch die Stärke des Wasserstrahles regulieren konnte.

Tabelle IX.

Äthylalkohol (käufl. absol.).

Volumenprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand
	8°	
5	1,87	6^h
6	1,05	4^h
7	1,22	$2^1/_2{}^h$
8	1,40	$1^1/_2{}^h$
	28°	
3	0,52	$5—6^h$
4	0,70	$4^1/_2{}^h$
5	0,87	$3^1/_4{}^h$
6	1,05	$2^1/_2{}^h$
7	1,22	30′
8	1,40	15′
	38°	
1	0,17	$3—4^h$
2	0,35	85′
3	0,52	1^h
4	0,70	1^h
5	0,87	30′
6	1,05	5—10′

Das Optimum der Temperatur für die Plasmaströmung bei Vallisneria liegt nach Velten[1]) bei 38,7°; bei 45° tritt Wärmestarre ein, bei 0° Kältestarre. Bei 8° war eine beträchtliche Verlangsamung zu konstatieren, doch stellte sich,

[1]) Velten, Flora 59, 211, 1897.

auch wenn die Schnitte viele Stunden der niederen Temperatur ausgesetzt gewesen waren, bei Zimmertemperatur die normale Geschwindigkeit rasch wieder her. Bei 38° trat Beschleunigung ein, doch war nach 3 bis 4 Stunden meist schon Verlangsamung zu beobachten, und bei längerer Einwirkung der höheren Temperatur trat häufig Stillstand ein. Lag die Temperatur nur wenig über 38°, so trat die Hemmung viel rascher ein.

Die Ergebnisse der Versuche mit Äthylalkohol habe ich in Tabelle IX zusammengestellt. Danach berechnete ich die Temperaturkoeffizienten für eine Temperaturzunahme um 10°, d. h. ich bestimmte das Verhältnis der Konzentrationen, die nach gleicher Zeit bei verschiedenen Temperaturen die Strömung hemmten. Die Koeffizienten sind, wie Tabelle X zeigt, meist kleiner als der Wert 2. Zunächst steigt die Giftigkeit

Tabelle X.

Temperaturkoeffizienten für Äthylalkohol.

Zwischen 8° und 18°	Zwischen 18° und 28°	Zwischen 28° und 38°
1,40 : 1,29 = 1,1	1,64 : 1,40 = 1,2	1,72 : 1,05 = 1,7
1,22 : 1,03 = 1,2	1,55 : 1,22 = 1,3	1,64 : 0,87 = 1,9
1,05 : 0,86 = 1,2	0,95 : 0,87 = 1,1	1,38 : 0,70 = 1,9
	0,86 : 0,70 = 1,2	1,29 : 0,35 = 3,7
		0,95 : 0,17 = 5,6

gleichmäßig mit der Temperatur an, für das Temperaturintervall zwischen 28 und 38° ist jedoch die Zunahme eine größere; besonders kommt dies zwischen verdünnteren Lösungen zum Ausdruck. Zehl[1]), auf dessen Arbeit ich noch zu sprechen komme, untersuchte eine große Reihe von Giften bei Temperaturen zwischen 12 und 40° und fand, daß zwischen 30 und 40° die Zunahme der Giftigkeit am größten ist. Man kann annehmen, daß bei diesen Temperaturen die Zelle Schädigungen erfährt und daß ihre Widerstandskraft gegen Gifte jeder Art geschwächt wird.

Die Versuche wurden alle im Dunkeln angestellt, nur in einigen Fällen machte ich Parallelversuche im Dunkeln und bei Belichtung. Sie ergaben, daß im Dunkeln die Hemmung der Plasmaströmung durch Alkohol früher zustande kommt als am Licht. Ich führe 2 Versuche mit 2 % Äthylalkohol an,

[1]) B. Zehl, Zeitschr. f. allgem. Physiol. 8, 172, 1908.

Tabelle XI.

Äthylalkohol — 2°/₀ — 38°.

	I. Dunkel.	II. Licht.
10^{h} 50	I. Dunkel.	II. Licht.
11^{h} 20	Strömung	Strömung
11^{h} 45	„	„
12^{h}	Stillstand	„
12^{h} 20		„
12^{h} 30		schwache Strömung
1^{h}		Stillstand
4^{h} 5	I. Dunkel.	II. Licht.
4^{h} 40	Strömung	Strömung
5^{h} 10	„	„
5^{h} 20	Stillstand	„
6^{h} 55		„
6^{h} 10		Stillstand.

in denen am Licht die Sistierung eine Stunde später eintrat als im Dunkeln. War die Strömung aber im Dunkeln zum Stillstand gekommen, so gelang es nicht, sie durch einen Lichtreiz wieder hervorzurufen, wie dies bei der Hemmung durch Sauerstoffentzug in den später angeführten Versuchen möglich war. In den Versuchen bei 38° trat in den meisten Fällen eine dauernde Schädigung ein, während bei niederen Temperaturen, z. B. bei 28°. durch Übertragen im Wasser gewöhnlich Erholung zu erzielen war.

Mit den übrigen Substanzen habe ich nur bei 38° Versuche gemacht und sie mit den bei Zimmertemperatur gewonnenen Resultaten verglichen. Sowohl die Alkohole als alle übrigen Substanzen zeigten eine Zunahme der Giftigkeit mit steigender Temperatur. Dies hat man bei der Mehrzahl der Gifte gefunden. Immerhin sind einige Ausnahmen bekannt. So stellte Meyer[1]) fest, daß die narkotische Wirkung von Monacetin, Benzamid und Salicylamid bei 30° erheblich geringer ist als bei 3°. Eine Erklärung hierfür findet er darin, daß der Teilungsquotient Öl-Wasser dieser Substanzen mit zunehmender Temperatur kleiner wird. So bot diese Tatsache eine Stütze für die Meyersche Theorie, daß der Teilungsquotient ein Maß für die narkotische Wirkung ist. Hier beruht die geringere Giftigkeit darauf, daß weniger Substanz in die Zelle eindringt. Zehl[2]) untersuchte die Keimfähigkeit der

---

[1]) H. H. Meyer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **46**, 338, 1901.

[2]) Zehl, l. c.

Sporen von Aspergillus und Penicillium bei Gegenwart verschiedener organischer und anorganischer Gifte und fand bei allen eine Steigerung mit zunehmender Temperatur mit Ausnahme von Chloroform, Äther, Benzamid, Äthylmethan. Er gibt keine Erklärung für dieses Verhalten. Hinsichtlich des Benzamids stimmt seine Angabe mit der von Meyer überein. Dagegen ist eine Angabe von Latham[1]) vorhanden, wonach Sterigmatocystis bei höherer Temperatur gegen Chloroform empfindlicher ist. Brooks[2]) studierte die Giftwirkung von Salpetersäure, Schwefelsäure und Kupfersulfat bei einigen Pilzen. Er machte erstens Versuche, bei denen er die Giftmenge ermittelte, die die Keimung verhindert und hier entfalteten die Substanzen bei höherer Temperatur eine stärkere Wirkung. In einer zweiten Reihe von Versuchen wurde Keimung und Wachstum im gifthaltigen Medium geprüft und hier ergab sich, daß die Wirkung des Giftes um so schwächer war, je näher die Temperatur dem Optimum des Wachstums lag. In diesem Falle wird also innerhalb gewisser Grenzen die Widerstandskraft der Zelle gegen das Gift mit steigender Temperatur erhöht und dadurch seine Wirkung geschwächt.

Tabelle XII.

Alkohol	Vol. %	Molare Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
			bei 38°	bei 18 bis 22°
Methyl	4	0,99	2h	unwirksam
„	5	1,24	45′	„
n-Propyl . . .	1	0,13	2½h	„
„ . . .	2	0,27	1h	24h
i-Butyl	0,5	0,05	1 bis 2h	unwirksam
„	1	0,11	20′	8h
tertiär-Butyl .	0,5	0,05	100′	unwirksam
„ .	1	0,11	30′	24h
i-Amyl	0,3	0,03	2½h	unwirksam
„	0,4	0,04	1h	12h
„	0,6	0,05	30′	—
tertiär-Amyl .	0,8	0,07	1½h	70h
„ .	1	0,09	1h	31h

1) M. E. Latham, Bull. Torrey Bot. Club 32, 337, 1905. Czapek, Biochemie II, 1905, S. 884 erwähnt, daß nach Chudjahow, Landw. Jahrb. 23, 333, 1894, Chloroformnarkose bei tiefen Temperaturen besser vertragen wird.

2) C. H. Brooks, Bot. Gaz. 42, 359, 1906.

Die Ergebnisse der Alkoholversuche habe ich in Tabelle XII zusammengestellt. Bei allen ist die Steigerung eine ziemlich beträchtliche. Konzentrationen, die bei Zimmertemperatur unwirksam waren, wirkten, bei 38° schon nach wenigen Stunden. Der Unterschied zwischen den Isomeren tritt hier wenig hervor, so zeigten i-Butyl und tertiär-Butyl in meinen Versuchen die gleiche Wirkungsstärke.

Auch Aceton zeigte eine erheblich gesteigerte Wirkung, wie die folgenden Zahlen erkennen lassen[1]).

Volumprozent	Molare Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
		bei 21° bis 22°	bei 38°
1	0,14	unwirksam	$1^1/_4{}^h$
2	0,27	"	1^h
3	0,41	16^h	50′
4	0,55	200′	10′

Bei Äthyläther wandte ich wegen seines niedrigen Siedepunktes (34,9°) nur eine Temperatur von 34° an. Die Zunahme der Giftigkeit ist eine sehr bedeutende, wie aus den angegebenen Werten hervorgeht.

	Molare Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
		bei 23° bis 26°	bei 34°
$^1/_4$ d. gesättigten Lösung	0,16	19^h	5 bis 10′
$^1/_8$ " " "	0,08	19^h	30′
$^1/_{16}$ " " "	0,04	unwirksam	45′
$^1/_{32}$ " " "	0,02	"	75′

Bei Äthylmethan kam ich zu folgendem Resultat:

Molare Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
	bei 23° bis 25°	bei 38°
$^1/_8$	120′	15 bis 20′
$^1/_{16}$	12^h	75′
$^1/_{32}$	18^h	2^h

Bei Chloroform war die Steigerung eine sehr bedeutende, wie die folgenden Zahlen zeigen.

Konzentration	Zeit, nach der die Strömung stillstand	
	bei 20° bis 23°	bei 38°
$^1/_{10}$ d. gesättigten Lösung	24^h	20′
$^1/_{20}$ " " "	unwirksam	48′
$^1/_{40}$ " " "	"	85′

[1]) H. H. Meyer, l. c. fand bei Aceton, Chloralhydrat und Äthylalkohol eine Zunahme der Wirkungsstärke parallel mit der Zunahme des Teilungsquotienten.

Für die drei letztgenannten Substanzen fand Zehl[1]) eine Abnahme der Giftigkeit mit zunehmender Temperatur. Es kommt eben ganz auf die Wahl der Objekte an und die Resultate lassen sich nicht ohne weiteres von einem auf das andere übertragen.

Die Zunahme der Giftwirkung bei Chloralhydrat ist aus folgenden Angaben ersichtlich.

Molare Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
	bei 25° bis 26°	bei 37° bis 38°
$^{1}/_{16}$	90′	5 bis 10′
$^{1}/_{32}$	6^{h}	30′
$^{1}/_{64}$	20^{h}	1^{h}

Versuche mit Säuren führten zu folgenden Ergebnissen:

Stoff	Molare Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
		bei 16°	bei 38°
Salzsäure . . .	$^{1}/_{200}$	4^{h}	1^{h}
" . . .	$^{1}/_{400}$	6^{h}	$2^{1}/_{2}{}^{h}$
Essigsäure . .	$^{1}/_{500}$	2^{h}	1^{h}
" . .	$^{1}/_{800}$	mehr als 3^{h}	2^{h}
n-Buttersäure .	$^{1}/_{1000}$	2^{h}	50′
i-Valeriansäure .	$^{1}/_{2000}$	105′	45′

Mangansulfat $^{m}/_{2000}$ und Zinksulfat $^{m}/_{4000}$, Konzentrationen, die bei Zimmertemperatur nur stimulierend wirken, rufen bei Temperaturen von 30° und 38° zunächst auch Beschleunigung der Strömung hervor, erst nach einigen Stunden tritt Verlangsamung ein. Die angegebenen Lösungen hemmten bei 30° erst nach 9 Stunden, bei 38° hemmte $MnSO_4$ $^{m}/_{2000}$ nach 8 Stunden, $ZnSO_4$ $^{m}/_{4000}$ nach 6 Stunden. Sowohl bei 30° als bei 38° zeigten die Kontrollproben in Wasser nach dieser Zeit schon eine merkliche Verlangsamung der Strömung.

Endlich habe ich auch die 3 Substanzen untersucht, bei denen Meyer eine Abnahme der Wirkung mit steigender Temperatur beobachtete, es waren Monacetin, Benzamid und Salicylamid. Ich fand im Gegensatz zu Meyer bei diesen Substanzen ebenfalls eine Steigerung bei erhöhter Temperatur. Der Unterschied trat bei den konzentrierteren Lösungen nicht hervor, erst bei solchen, die nach längeren Zeiträumen Hemmung verursachen. Wurden die Schnitte aus den Lösungen dieser Stoffe in Wasser übertragen, so stellte sich die Strömung rasch wieder ein.

Monacetin ist eine in Wasser leicht lösliche Substanz. Die wässerige Lösung reagierte sauer. Ich stellte mir von einem Kahlbaum-

[1]) Zehl, l. c.

schen Präparat eine Lösung her, die 0,660 g in 50 ccm Wasser enthielt (0,01 Mol), und eine zweite Lösung, die 4,242 g in 100 ccm Wasser enthielt (0,32 Mol), und diese wurde dann weiter verdünnt. Die Zeiten für den Eintritt der Hemmung sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Konzentration	Zeit	
	bei 17°	bei 30°
0,32 Mol.	33′	33′
0,32 „	40′	25′
0,16 „	70′	70′
0,16 „	60′	60′
0,08 „	6^h	5^h
0,01 „	8^h	$2^1/_2{}^h$
0,01 „	$> 3^1/_2, < 18^h$	2^h
0,01 „	9^h	2^h

Bei 38° ist die Steigerung noch größer, 0,01 Mol Monacetin rief hier schon nach 30′ Hemmung hervor. Meyers Ansicht wird also vielleicht nur für die lipoidreichen Tierzellen Geltung haben.

Salicylamid ist in kaltem Wasser sehr schwer löslich. In heißem Wasser ist die Löslichkeit etwas größer. Zur Verwendung gelangte ein Präparat von Kahlbaum. Nach einigen Tagen gingen immerhin auch bei Zimmertemperatur bei häufigem Rühren und Schütteln etwa 0,01 Mol in Lösung. Diese Lösung zeigte schwach saure Reaktion; sie hemmte schon nach wenigen Minuten die Strömung, auch die auf die Hälfte verdünnte Lösung wirkte ziemlich rasch und es war kein Unterschied bei 17° und bei 30°; erst bei der aufs 4fache verdünnten Lösung trat die Steigerung hervor, wie die folgenden Zahlen erkennen lassen.

Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat	
	bei 17°	bei 30°
$^1/_2$ der gesättigten Lösung	25′	25′
$^1/_2$ „ „ „	15′	20′
$^1/_2$ „ „ „	45′	15′
$^1/_4$ „ „ „	6^h	3^h
	bei 17°	bei 38°
$^1/_2$ der gesättigten Lösung	20′	20′
$^1/_4$ „ „ „	8^h	50′

Benzamid ist so wie Salicylamid in kaltem Wasser sehr wenig löslich, viel besser dagegen in heißem Wasser. Ich stellte mir von einem Kahlbaumschen Präparat eine gesättigte Lösung her; sie enthielt etwas mehr als 0,01 Mol. im Liter und reagierte neutral.

Konzentration	Zeit, nach der Stillstand eintrat			
	14°	17°	30°	38°
Gesättigte Lösung	—	20′	—	20′
„ „	—	35′	35′	—
$^1/_2$ der gesättigten Lösung .	—	1^h	80′	—
$^1/_2$ „ „ „ .	—	8^h	—	50′
$^1/_2$ „ „ „ .	6^h	—	90′	—

Mit KCN machte ich einige Versuche bei 30° mit Konzentrationen $^1/_{100}$ bis $^1/_{1000}$ Mol, in einigen Fällen trat die Hemmung früher ein als bei Zimmertemperatur, in manchen Fällen war wieder kein Unterschied zu sehen. Konzentrationen von $^1/_{40}$ und $^1/_{80}$ Mol. wirkten bei 30° sogar manchmal schwächer als bei 20°. Bei Zusatz von Alkali (KOH $^1/_{1000}$ Mol.), das die Cyankaliwirkung fördert, trat eine deutliche Steigerung bei erhöhter Temperatur hervor, $^1/_{200}$ Mol. z. B. hemmte bei 30° nach 4 Stunden, während bei 18° erst nach etwa 20 Stunden Stillstand hervorgerufen wurde.

4. Chemische Einflüsse.

A. Versuche mit Mangansulfat und Zinksulfat.

Es ist bekannt, daß viele Metallsalze in minimalen Dosen kräftige Wachstumsreize sind. Von Mangansalzen speziell weiß man, daß sie die Oxydationsprozesse fördern. — Ich wählte zu meinen Versuchen Mangansulfat und Zinksulfat. Beide stimulieren in minimalen Konzentrationen der Plasmaströmung. Es war nun von Interesse, zu erfahren, ob auch die Gegenreaktion der Zelle gegen Alkohole durch sie gefördert wird. Diese besteht bei den niederen, leicht oxydablen Gliedern der Reihe, wie man aus Tierversuchen weiß[1]), darin, daß der Alkohol verbrannt wird. Es ist möglich, daß dies auch im pflanzlichen Organismus geschieht; Angaben darüber liegen jedoch nicht vor.

Ich stellte zunächst fest, welche Salzkonzentrationen von den Zellen ohne Schädigung vertragen werden und deutliche Stimulation bewirken. Dann kombinierte ich die Wirkung dieser Lösungen, es waren $^m/_{8000}$ $MnSO_4$ und $^m/_{4000}$ $ZnSO_4$ mit verschiedenen Alkoholen; $ZnSO_4$ ist giftiger, darum wählte ich eine verdünntere Lösung. Es wurden stets drei Versuche nebeneinander aufgestellt: 1. Alkohol, 2. Alkohol + Metallsalz. 3. Metallsalz. Sie ergaben, daß die Kombination Alkohol +

[1]) H. H. Meyer und R. Gottlieb, Die experimentelle Pharmakologie. Berlin, Wien 1910, S. 46.

Metallsalz schwächer wirkt als Alkohol allein. So hemmte in einem Versuche 8 °/₀ Äthylalkohol nach $1\frac{1}{4}$ Stunden, derselbe Alkohol mit $MnSO_4$ $m/_{2000}$ erst nach mehr als 4 Stunden. 2 °/₀ n-Prophylalkohol hemmte nach $1\frac{3}{4}$ Stunden bei Zusatz von $MnSO_4$ oder $ZnSO_4$ war nach 20 Stunden noch Strömung vorhanden. Auch bei Iso-Butylalkohol fand eine Abschwächung statt, jedoch nicht bei Isoamyl- und Heptylalkohol; die Kombination Alkohol-Metallsalz hemmte hier nach gleicher Zeit wie Alkohol allein. Die abschwächende Wirkung trat beim Mangansulfat stärker hervor als beim Zinksulfat. Der Unterschied zwischen höheren und niederen Alkoholen kann darauf beruhen, daß die letzteren, die leicht oxydabel sind, bei Salzzusatz leichter durch Verbrennung aus dem Stoffwechsel entfernt werden, doch können auch andere Erklärungen für diese Tatsache gegeben werden.

Wurde Alkohol in Konzentrationen angewandt, die rasch wirken, z. B. 10 °/₀iger Äthylalkohol, 4 °/₀iger n-Prophylalkohol, so konnte keine oder nur eine geringe Abschwächung durch eines der beiden Metallsalze bewirkt werden. Es konnte auch keine Wiederkehr der Strömung erzielt werden, wenn die Schnitte nach Hemmung derselben durch Alkohol sofort in die Salzlösung gebracht und längere Zeit darin belassen wurden. Versuche mit Chloroform, Chloralhydrat und Äthylurethan in Kombination mit Mangansulfat ergaben, daß dieses bei den zwei ersten Substanzen keine Verzögerung der Hemmung bewirkt, bei Äthylurethan war aber eine geringe Abschwächung zu bemerken.

Mit Säuren habe ich in gleicher Weise Untersuchungen ausgeführt, die das entgegengesetzte Ergebnis lieferten. Die Kombination Säure + Metallsalz erzeugte in kürzerer Zeit Stillstand als Säure allein. So hemmte z. B. $m/_{2000}$ HCl nach 9 Stunden, $m/_{2000}$ HCl mit $m/_{4000}$ $ZnSO_4$ oder $m/_{2000}$ $MnSO_4$ schon nach 6 Stunden. $m/_{2000}$ Buttersäure hemmte nach mehr als 9 Stunden, bei Salzzusatz schon nach 4 Stunden. $m/_{1000}$ Essigsäure hemmte nach mehr als 5 Stunden, bei Salzzusatz schon nach 4 Stunden. Bei Isovaleriansäure kam die Steigerung nur wenig zum Ausdruck.

Die Versuche wurden alle im Dunkeln und die meisten bei Zimmertemperatur angestellt. Nur mit Äthylalkohol und Mangansulfat habe ich auch Versuche bei 28 und 38° gemacht.

In diesen Fällen fand ebenfalls eine Abschwächung der Alkoholwirkung statt, bei 38° allerdings erst, als ich eine schwächere Konzentration, statt $^m/_{2000}$ $^m/_{6000}$ wählte. Es wirkt ja das Salz bei höherer Temperatur viel giftiger, und darum war dieses Verhalten auch vorauszusehen.

Zehl[1]) fand gleichfalls, daß die Kombination Metallsalz und Alkohol schwächer wirkte als Alkohol allein, er verwendete i-Butyl und i-Amylalkohol; bei Chloralhydrat, Chloroform und Äther fand er jedoch eine Verstärkung bei gleichzeitiger Anwendung von Metallsalzen. Er verwendete $CuSO_4$, $CoSO_4$, $NiSO_4$, $Al_2(SO_4)_3$. Eisler und Portheim[2]) beobachteten, daß die Hemmung der Plasmaströmung durch Chinin bei gleichzeitiger Anwendung von verdünnten Metallsalzlösungen verzögert wird, und zwar trat diese Wirkung bei den mehrwertigen Kationen besonders stark hervor; sie arbeiteten u. a. auch mit Mangansulfat.

Es ist möglich, daß der Unterschied zwischen leicht und schwer oxydablen Stoffen auf einer oxydationsfördernden Wirkung der Metallsalze beruht; bei Chloralhydrat und Chloroform, die beide schwer oxydabel sind, war ja auch keine Abschwächung durch Mangansulfat zu erzielen. Doch könnte man die Entgiftung des Alkohols durch Metallsalze auch durch eine Permeabilitätsänderung der Plasmahaut erklären. Szücs[3]) hat gezeigt, daß besonders die mehrwertigen Metallsalzkationen den Eintritt von Farbstoffen in die Zelle hemmen. Darum stellte ich auch Versuche mit Alumiumnitrat und Alkohol an, die dasselbe Resultat lieferten wie die Versuche mit Mangan- und Zinksulfat. Bei Äthyl- und Propylalkohol trat eine Verzögerung der Wirkung ein, bei Amylalkohol jedoch nicht. Die Abschwächung war aber nicht so deutlich wie bei Mangansulfat. Daß bei den höheren Alkoholen die Entgiftung nicht eintritt, könnte man darauf zurückführen, daß sie stärker adsorbiert werden als die Salze, dasselbe könnte man auch bei Chloroform annehmen.

B. Versuche mit Cyankalium.

Cyankalium hat in verdünnten Lösungen erregende Eigenschaften. In stärkeren Konzentrationen wirkt es namentlich stark hemmend auf Oxydationen. Lösungen von $^1/_{1000}$ und

---

[1]) Zehl, l. c. 165.

[2]) M. v. Eisler und L. v. Portheim, diese Zeitschr. 21, 59, 1909.

[3]) J. Szücs, Studien über Protoplasmapermeabilität. Sitzungsber. d. Wien. Akad., mathem.-naturw. Kl., 119, Abt. I, Juli 1910.

$^1/_{2000}$ Mol. riefen deutliche Stimulation der Plasmaströmung hervor und wurden von Vallisneriazellen mehrere Tage hindurch vertragen, ohne sie zu töten. Auch $^1/_{4000}$ Mol. stimulierte noch und hemmte erst nach mehr als 48 Stunden. Ferner zeigte es sich, daß $^1/_{100}$ bis $^1/_{800}$ Mol. später Hemmung bewirkten als $^m/_{1000}$ und $^m/_{2000}$. Dieses Verhalten erinnert an die Fällungszonen bei der Fällung von Emulsionskolloiden durch Metallsalze. Durch Zusatz von Alkali ($^m/_{1000}$ KOH) wurde die Wirkung des Cyankalis verstärkt, und es verschwand der Gegensatz der verschiedenen Konzentrationen, d. h. $^m/_{100}$ bis $^m/_{800}$ bewirkten viel früher Hemmung als die weiteren Verdünnungen. Alle Versuche mit Kaliumcyanid wurden im Dunkeln ausgeführt.

Die Kombination von Cyankali mit Alkohol ergab in allen Fällen eine Summation der beiden Wirkungen, und zwar war die Verstärkung eine gegenseitige, sowohl nicht hemmende, sondern nur stimulierende Gaben von KCN ($^m/_{10000}$, $^m/_{20000}$) verstärkten die Alkoholwirkung, als auch umgekehrt die Cyanidwirkung durch an sich unschädliche Alkohollösungen (2 $^0/_0$iger Äthylalkohol) gesteigert wurde. Diese Verstärkung trat auch bei Alkaligegenwart auf; es wurde $^m/_{1000}$ NaOH verwendet, das für sich die Zellen erst nach sehr langer Zeit schädigt. Nach den wenigen Versuchsdaten, über die ich verfüge, scheint es jedoch, als ob das Alkali die kombinierte Alkoholcyanidwirkung etwas verzögern würde.

Auch die Kombination von Chloroform und Äthylurethan mit Kaliumcyanid hemmte etwas früher als diese Substanzen allein. Bei Chloralhydrat bewirkte KCN-Zusatz keinen Unterschied gegenüber der reinen Lösung dieses Stoffes.

Bekanntlich hat nach anderen Methoden und von anderen Gesichtspunkten ausgehend Loeb[1]) gefunden, daß die Giftwirkung von Alkohol, Chloralhydrat, Phenylurethan und Chloroform auf Seeigeleier durch Natriumcyanid gehemmt wird. Umgekehrt fand Warburg[2]), daß die oxydationshemmende Wirkung der Blausäure bei Erythrocyten durch Alkohol und Urethan gehemmt wird; doch konnte er keine Abschwächung beobachten bei Zusatz von geringen Kaliumcyanidmengen zu stark hem-

---

[1]) J. Loeb, diese Zeitschr. 29, 80, 1910.

[2]) O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 331, 1912.

menden Gaben von Urethan. In welchem Verhältnis diese Beobachtungen zu meinen Versuchsergebnissen stehen, ist bisher noch unaufgeklärt.

5. Versuche mit Sauerstoffentziehung.

Die Frage der Beeinflussung der oxydativen Leistungen der Zelle spielt in den modernen Theorien der Narkose eine wichtige Rolle. Verworn[1]) hat zuerst diese Frage aufgeworfen mit seiner Hypothese, daß die Narkose einer Erstickung gleichkäme. Daß durch Narkotika die Sauerstoffaufnahme herabgesetzt wird, ist durch verschiedene Forscher sichergestellt worden, ich erinnere hier an die zahlreichen Arbeiten aus der Schule Verworns, so die Arbeiten von Winterstein[2]), Fröhlich[3]), Nagai[4]) u. a., ferner an die Versuche von Warburg[5]) mit roten Blutkörperchen und Seeigeleiern. Es wurde auch festgestellt, daß Oxydationsprozesse durch Narkotika behindert werden, so durch Pick und Joannovics[6]), die zeigten, daß die Oxydation von Fetten zu Fettsäuren, die in der Leber normalerweise erfolgt, bei Anwesenheit eines Narkotikums nicht vor sich geht. Baer und Meyerstein[7]) fanden, daß die Oxydation von Buttersäure und Oxybuttersäure zur Acetessigsäure und Aceton in der Hundeleber durch Alkohol, Aldehyde und andere Narkotika herabgesetzt wird, während andere, diesen nahestehende, aber nicht narkotisch wirkende Stoffe keinen Einfluß auf den Verlauf dieser Vorgänge haben.

Man kann die geringere Sauerstoffaufnahme als Ursache für die Einschränkung der Oxydationsprozesse ansehen, man kann aber auch letzteres als das Primäre und ersteres nur als dessen Folge betrachten. Die erstere Auffassung wird durch

---

[1]) Verworn, Die Narkose. Jena 1912.

[2]) Hans Winterstein, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **1**, 19, 1902; **5**, 323, 1905.

[3]) Friedrich W. Fröhlich, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **3**, 75, 1903.

[4]) H. Nagai, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **5**, 34, 1905.

[5]) Otto Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**, 452, 1910; **70**, 413, 1911; **71**, 479, 1911.

[6]) E. P. Pick und G. Joannovics, Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 327, 1911.

[7]) J. Baer und W. Meyerstein, Arch. f. experim. Pathol. **63**, 441, 1911.

Mansfeld[1]) vertreten. Nach ihm beruht die verminderte Sauerstoffaufnahme darauf, daß die Lipoide, die nach seiner Ansicht die Rolle von Sauerstoffüberträgern spielen, wenn ein Narkotikum in ihnen gelöst ist, weniger Sauerstoff absorbieren; die ungenügende Sauerstoffversorgung bewirkt dann die Erstickung. E. **Hamburger**[2]) hat gezeigt, daß Lösungen von Narkoticis in Olivenöl weniger Sauerstoff absorbieren als reines Olivenöl, wodurch die eine Voraussetzung **Mansfelds** als richtig erscheint.

Doch kann man auch von der Annahme ausgehen, daß die Behinderung der Oxydationsvorgänge die Ursache für die geringere Sauerstoffaufnahme bildet; es wird weniger Sauerstoff aufgenommen, weil er nicht verarbeitet werden kann. Der Hauptunterschied der beiden Auffassungen liegt darin, daß die erstere als Bedingung für den Eintritt der Narkose lediglich eine Ansammlung des Narkotikums in den Lipoiden der Plasmahaut annimmt, während die zweite eine Reaktion desselben mit dem Polioplasma voraussetzt. Diese letztere Anschauung, die vielfach vertreten wird, hat auch viel Wahrscheinlichkeit für sich. Einige Gründe, die dafür sprechen, habe ich auch schon in der Einleitung angeführt. Daß die Wirkung eines Narkoticums nicht der des Sauerstoffmangels gleich zu setzen ist, dagegen spricht schon das Verhalten der anaeroben Organismen, die Sauerstoffmangel sehr gut vertragen und sich doch leicht narkotisieren lassen. Bei Nitella kommt nach **Kühne**[3]) die Strömung oft erst nach wochenlangem Sauerstoffmangel zum Stillstand, während sie durch Narkotika ebenso rasch gehemmt wird, wie bei anderen Pflanzen.

Was hat man nun von der Kombination von Narkoticum und Sauerstoffmangel zu erwarten? **Mansfeld**[4]) hat bei Kaulquappen eine Summation der beiden Faktoren gefunden und nimmt dies als Beweis für die Richtigkeit seiner Hypothese.

---

[1]) G. **Mansfeld**, Narkose und Sauerstoffmangel I. Arch. f. d. ges. Physiol. **129**, 69, 1909.

[2]) **Elisabeth Hamburger**, Narkose und Sauerstoffmangel IV. Arch. f. d. ges. Physiol. **148**, 186.

[3]) **Kühne**, Über die Bedeutung des Sauerstoffes für die vitale Bewegung II. Zeitschr. f. Biol. **18**, 425, 1898.

[4]) **Mansfeld**, l. c.

Er sagt aber selbst[1]), daß dieser Beweis nicht zwingend ist, denn eine Summation von Narkoticum und Sauerstoffmangel könne auch zustande kommen, wenn beide einen verschiedenen Angriffspunkt haben, wie man dies auch vielfach bei Kombinationen von Giften gefunden hat.

Bei meinen diesbezüglichen Untersuchungen habe ich eine solche Summation nicht finden können, wenn die Versuche bei Zimmertemperatur angestellt wurden, wohl aber trat sie zutage, als ich Temperaturen von 30° und über 30° anwandte. Doch machte ich diese Wahrnehmung nicht nur bei Narkoticis, sondern auch bei verschiedenen anderen Giften, z. B. bei einigen Säuren, bei $MnSO_4$, $HgCl_2$ usw. Bei erhöhter Temperatur waren die Schnitte von Vallisneriablättern auch gegen Sauerstoffmangel viel empfindlicher. Man kann also aus diesen Resultaten schließen, daß erhöhte Temperatur und Sauerstoffentzug zusammen die Zellen gegen Gifte jeder Art weniger widerstandsfähig machen.

Zu den ersten Versuchen benutzte ich eine Wasserstrahlpumpe, durch die der Luftdruck auf etwa 20 mm herabgesetzt werden konnte. An die Pumpe wurden 2 Glasflaschen angeschlossen und in diese die Schnitte eingelegt. Die ersten Versuche wurden am Licht gemacht. Später wurden die Flaschen durch Umwickeln mit schwarzem Papier verdunkelt.

In einigen Vorversuchen überzeugte ich mich, daß die Schnitte im Wasser, auch wenn sie viele Stunden dem niedrigen Luftdruck angesetzt waren, keine Behinderung der Strömung zeigten. Es ist durch die Untersuchungen von Clark[2]) bekannt, daß die Plasmaströmung bei Vallisneria erst zum Stillstand kommt, wenn der Partiärdruck des Sauerstoffes bis auf etwa 2 mm gesunken ist. Ferner prüfte ich, wie sich die Alkoholkonzentration der Lösung während des Evakuierens änderte. Dies geschah durch Tensionsbestimmungen mit dem Capillarmanometer vor und nach dem Evakuieren. Die festgestellten Zahlen wurden mit den früher für die einzelnen Alkoholkonzentrationen ermittelten verglichen. So fand ich für 5%igen n-Propylalkohol bei 22° folgende Tensionswerte:

Vor dem	Evakuieren:		0,6063
Nach	10′	„	: 0,6179
„	20′	„	: 0,6946
„	30′	„	: 0,6946
„	40′	„	: 0,7179
„	60′	„	: 0,7495

Der letzte Wert entspricht etwa einer 2%igen Lösung.

---

[1]) Mansfeld, l. c. S. 80.

[2]) J. Clark, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1888, 273.

Die Änderung erfolgte immer in dem Sinne, daß der Alkoholgehalt der Lösung abnahm, wie es auch nach der Theorie der fraktionierten Destillation zu erwarten war[1]). Da diese Abnahme eine beträchtliche war, wurden die Versuche folgendermaßen angestellt. In beide Flaschen wurde eine Lösung von gleicher Alkoholkonzentration gefüllt, dann wurden beide gleichlange der Einwirkung der Pumpe ausgesetzt und hierauf in der einen Luft zugelassen, während die zweite unter Luftabschluß verblieb. So hatten beide Lösungen dieselbe Konzentration. Das Evakuieren dauerte in einigen Versuchen $^1/_2$ Stunde, in den meisten nur 10 Minuten; es war auch dann gewöhnlich die maximale Luftverdünnung erzielt, die mit der Pumpe überhaupt zu erreichen war. Die Versuche zeigten alle übereinstimmend, daß die Alkohole im luftverdünnten Raume keine stärkere Wirkung entfalteten.

Um den Sauerstoff gründlicher zu entfernen, wurde in den weiteren Versuchen ein Wasserstoffstrom angewendet. Den Wasserstoff stellte ich aus arsenfreiem Zink und chemisch reiner Schwefelsäure her. Der Wasserstoffapparat (nach den Angaben Prof. Czapeks gemacht) bestand aus zwei länglichen Glasgefäßen, die unten zu Röhren verengt waren, die mit eingeschliffenen Glashähnen verschließbar waren. Die beiden Röhren standen durch einen Kautschukschlauch in Verbindung. Das eine Gefäß wurde mit 12 $^0/_0$iger Schwefelsäure, das andere mit verkupfertem Zink gefüllt. Durch Öffnen der Hähne war die Verbindung zwischen beiden Gefäßen hergestellt und durch Heben und Senken des Säuregefäßes konnte der Gasstrom reguliert werden. Der Wasserstoffstrom ging zunächst durch zwei Waschflaschen mit Kaliumpermanganat und konzentrierter Schwefelsäure, dann durch eine Flasche, in der sich konzentrierte Kalilauge befand. Durch den Stöpsel dieses Gefäßes war ein Glasrohr gesteckt, an dem ein Papiersäckchen mit Pyrogallol befestigt war; durch Neigen wurde das Pyrogallol in die Kalilauge geschüttet, und an der Färbung der Lösung erkannte man, wie weit der Sauerstoff entfernt war. An dieses Gefäß waren hintereinander zwei Glaskammern geschaltet. Sie waren an den Enden zu Röhren verengt, in der Mitte flach und breit; an der oberen Wand wurden in einem Flüssigkeitstropfen die Schnitte angebracht. Die Kammern ruhten auf den Objekttischen von Mikroskopen, es war also eine direkte mikroskopische Beobachtung der Zellen während des Versuches ermöglicht. Über die Mikroskope mit den Gaskammern wurde ein schwarzes Tuch gebreitet, das nur für die Dauer der Beobachtung entfernt wurde. Von der zweiten Gaskammer führte eine Verbindung zur Pumpe. Diese konnte durch einen Schraubenquetschhahn versperrt werden. Ebenso waren die Gaskammern durch einen Schraubenquetschhahn von dem Wasserstoffapparat abzuschließen.

Zuerst wurde immer Wasserstoff durchgeleitet, dabei war die Pumpe nur wenig geöffnet, um das Gas durchzusaugen, dann wurde die Wasserstoffentwicklung eingestellt und einige Minuten evakuiert, dann wieder Wasserstoff durchgeleitet und dieses Verfahren beliebig oft wiederholt.

---

[1]) Siehe Nernst, Theoret. Chemie, 6. Aufl., S. 111.

In der ersten Gaskammer befanden sich die Schnitte in Wasser, in der zweiten in Alkohol. Die geschilderte Versuchsanordnung hat den Nachteil, daß man in die Kammern nur geringe Flüssigkeitsmengen bringen kann, und so geschah es mehrmals, daß die ganze Flüssigkeit verdunstete und die Schnitte eintrockneten.

Im Wasser kam die Strömung im Dunkeln nach 1 bis 2 Stunden zum Stillstand, stellte sich aber dann bei Belichtung nach wenigen Augenblicken wieder her. Bei fortwährender Belichtung habe ich die Strömung im Wasser nicht hemmen können, denn sehr viele Stunden hindurch konnte ich nicht Wasserstoff erzeugen, ohne den Apparat wieder frisch mit Säure versehen zu müssen, und dabei kam wieder Sauerstoff hinein. Bei Licht dauert es also erheblich länger, doch kommt früher oder später die Strömung jedenfalls zum Stillstand.

Im Alkohol trat die Hemmung im Wasserstoffstrom nie früher ein als in den Kontrollversuchen, die ich bei normaler Sauerstoffversorgung stets aufgestellt hatte. Allerdings wird jedenfalls die Alkoholkonzentration geändert, die Lösung wird verdünnter; die Verstärkung müßte also schon eine ziemlich beträchtliche sein, wenn sie bei dieser Versuchsanordnung zum Ausdruck kommen sollte. Die Schnitte, die in Alkohol lagen, zeigten meist ebenso lange Strömung wie die im Wasser, in manchen Fällen auch länger, selten aber kürzer. Wurden die Zellen längere Zeit mit Alkohol vorbehandelt ($^1/_2$ bis 1 Stunde) und dann dem H_2-Strome ausgesetzt, so hörte in manchen Fällen die Strömung früher als in den in Wasser liegenden Zellen auf, aber der Unterschied war kein auffallender. Schnitte in Alkohol, bei denen die Strömung im Dunkeln sistiert war, zeigten auf Lichtreiz meist eine rasche Wiederkehr derselben.

Das bisher Gesagte gilt für die Versuche bei Zimmertemperatur. Bei den Versuchen bei erhöhter Temperatur begnügte ich mich mit der Luftverdünnung, die durch die Wasserstrahlpumpe zu erzielen war. Auf die direkte mikroskopische Betrachtung mußte ich verzichten, ich mußte mit größeren Flüssigkeitsmengen und weiteren Gefäßen arbeiten, weil die Flüssigkeiten bei den angewandten Temperaturen und dem niedrigen Luftdrucke heftig siedeten und zum Teil in die Röhren und Verbindungsschläuche hin aufgesaugt wurden. Die Schnitte wurden in zwei längliche Glasfläschchen gelegt, die mit einem fest schließenden, einfach durchbohrten Kautschukstöpsel verschlossen waren; durch die Bohrung ging ein Glasrohr, das durch eiuen Vakuumschlauch an die Pumpe angeschlossen war. Durch einen Schraubenquetschhahn konnte die Verbindung mit der Pumpe unterbrochen werden. Die Glasfläschchen wurden

durch Hülsen aus Zinkblech verdunkelt und lagen im Wasserbade, das für die ersten Versuche auf 38° geheizt wurde. In dem einen Gefäß befanden sich die Schnitte in Alkohol oder einer anderen zu prüfenden Substanz, in dem zweiten in Wasser; außerdem befanden sich im Wasserbade je ein Kontrollversuch mit Wasser und mit Alkohol bei gewöhnlichem Luftdruck in kleinen Röhrchen, wie ich sie früher beschrieben habe. Bei 38° ergab sich in allen Fällen eine Summation von Sauerstoffentzug und Alkohol, trotzdem der Alkohol durch das Evakuieren verdünnter war als in den Kontrollversuchen.

Ich untersuchte Äthyl-, n-Propyl- i-Butyl, Tertiär-Butyl-, i-Amyl- und Tertiär-Amylalkohol. Die Schnitte zeigten sich bei 38° auch in Wasser gegen Sauerstoffmangel bedeutend empfindlicher als bei Temperaturen um 20° herum. Nach einer Stunde trat häufig schon eine Verlangsamung der Strömung, mitunter auch völlige Hemmung ein. Darum wählte ich zu den weiteren Versuchen Temperaturen von 30 und 32°, bei denen der Sauerstoffmangel doch erst nach einigen Stunden Hemmung bewirkt. Besonders wurde diese Hemmung noch verzögert, als ich die Versuche nicht im Dunkeln wie anfangs, sondern bei Belichtung ausführte. Doch auch hier zeigten die verwendeten Stoffe das gleiche Verhalten, und zwar prüfte ich nicht nur Narkotica, sondern auch andere Gifte, so n-Buttersäure, Valeriansäure, Salzsäure, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $HgCl_2$, KCN. Da bei diesen Substanzen die Konzentrationsänderung so erfolgte, daß die Lösungen konzentrierter wurden, verwendete ich zu den Kontrollversuchen Lösungen, die ebenso lange der Einwirkung der Pumpe ausgesetzt wurden wie die Parallelversuche bei Luftabschluß, in die ich aber erst nach dem Evakuieren die Schnitte einlegte. So hatte ich Lösungen von gleicher Verdünnung zum Vergleich.

Es zeigte sich in allen Versuchen, die bei erhöhter Temperatur gemacht wurden, daß bei Sauerstoffmangel die Giftwirkung stärker war als bei reichlicher Versorgung mit Sauerstoff.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen über die Hemmung der Plasmaströmung bei Vallisneria durch Narkotica und einige andere Gifte führten zu folgenden Feststellungen.

1. Es wurde die Abhängigkeit der Wirkung von Konzentration und Zeit ermittelt, in einigen Fällen auch graphisch dargestellt.

2. Für die homologe Reihe der einwertigen Alkohole stellte es sich heraus, daß die Zunahme der Giftigkeit annähernd dem Traubeschen Gesetz entspricht.

3. Es wurden die Oberflächenspannungswerte der wirksamen Lösungen bestimmt; sie ergaben, daß die Oberflächenspannung nicht maßgebend für die hemmende Wirkung auf die Plasmaströmung ist.

4. Alle untersuchten Substanzen zeigten bei höherer Temperatur eine gesteigerte Wirkung; es wurden Temperaturen bis zu 38° angewandt.

5. Die Kombination von Alkohol mit $MnSO_4$ und $ZnSO_4$ wirkte schwächer als Alkohol allein; eine Ausnahme bildeten Iso-Amyl- und Heptylalkohol, bei denen Salzzusatz keine Änderung der Hemmungszeit hervorrief. Das gleiche Resultat lieferten Versuche mit Alkoholen und Aluminiumnitrat. Äthylurethan wurde durch $MnSO_4$ etwas abgeschwächt, bei Chloralhydrat und Chloroform war keine Änderung der Hemmungszeit durch Zusatz von $MnSO_4$ zu beobachten. Salzsäure und Fettsäuren wirkten mit $MnSO_4$ und $ZnSO_4$ zusammen stärker als Säure allein. Vielleicht lassen sich diese Ergebnisse auf eine Permeabilitätsänderung der Plasmahaut durch die Metallsalze zurückführen, die bei den höheren Alkoholen und beim Chloroform nicht zustande kommt, weil diese Stoffe infolge ihrer stärkeren Adsorbierbarkeit die Salze verdrängen. Eventuell könnte man bei Äthylalkohol und Äthylurethan auch an eine Beteiligung der oxydativen Vorgänge denken.

6. Alkohol und Cyankali verstärkten sich gegenseitig. Durch Alkalizusatz wurde in einigen Fällen diese kombinierte Wirkung etwas verzögert. Äthylurethan wurde durch KCN verstärkt. Bei Chloroform und Chloralhydrat bewirkte KCN-Zusatz keine Änderung oder eine ganz geringe Verstärkung.

7. Sauerstoffentzug rief bei Zimmertemperatur keine Verstärkung der Alkoholwirkung hervor. Bei Temperaturen von 30 und über 30° setzte jedoch Sauerstoffmangel die Widerstandskraft der Zellen gegen Alkohole und auch gegen alle anderen untersuchten Substanzen bedeutend herab; es waren dies Säuren, Sublimat, Cyankali u. a.

Über adaptative Fermentbildung im Verdauungskanal.

Von

Armin von Tschermak.

(Aus dem physiolog. Institut der tierärztlichen Hochschule, Wien.)

(Eingegangen am 5. August 1912.)

Das so vielseitige Problem der Anpassung, das ich speziell am Auge, am Gehirn und am Muskel studiert habe[1]), führte mich schon vor längerer Zeit dazu — besonders unter dem Einflusse der grundlegenden Forschungen J. P. Pawlows über die quantitative Abstufung in der Arbeit der Verdauungsdrüsen —, die Frage in Angriff zu nehmen, ob die Verdauungsdrüsen imstande sind, anpassungsmäßig Fermente zu bilden.

Auf diesem Gebiete liegt der Nachweis E. Weinlands[2]) vor, daß mehrwöchige Milchfütterung — nicht so Fütterung mit dem Spaltungsprodukt des Milchzuckers, der Galaktose, oder subcutane Milchzuckerinjektion — bei erwachsenen Hunden, bei denen normalerweise die Lactase aus dem Pankreas- und Darmsafte verschwunden ist, zu deren Neuauftreten führen kann. F. A. Bainbridge[3]) bestätigte unter Starlings Leitung die Angabe E. Weinlands und fand überdies, daß nach intravenöser Injektion eines Extraktes, das von der Dünndarmschleimhaut

---

[1]) Über physiologische und pathologische Anpassung des Auges. Leipzig 1900. — Das Anpassungsproblem in der Physiologie der Gegenwart. Arch. des sciences biol. (Pawlow-Festschrift), St. Petersburg 1904. — Physiologie des Gehirns. Handb. d. Physiol. 4, 1, herausg. von W. Nagel, Braunschweig 1905.

[2]) Über die Lactase des Pankreas. Zeitschr. f. Biol. 38, 607 bis 617, 1899; II. Mitteil.: Zur Frage nach den Ursachen, welche die Bildung der Lactase hervorrufen. Ebenda 40, 386 bis 391, 1900.

[3]) On the adaptation of the pancreas. Proc. Roy. Soc. 72, 35 bis 39, 1903; Journ. of Physiol. 31, 98, 1904.

eines mit Milch behandelten Tieres gewonnen war, Lactaseproduktion im Pankreas auftritt. Hingegen gelang es E. Weinland[1]) an kleinen Hunden nicht, durch Verfütterung solcher Polyosen, die nicht typische Nahrungsbestandteile sind, so Inulin, Salepschleim sowie Steinnußspäne (Polymannosen enthaltend), endlich Agar-Agar (Galakton), neuartige Verdauungsfermente hervorzurufen. In einer gewissen Beziehung zu obigem Probleme stehen weiterhin die erfolgreichen Versuche E. Weinlands[2]), durch längerdauernde parenterale, subcutane Zufuhr von Rohrzucker — nicht aber von Inulin — das Auftreten von Invertase im Blute hervorzurufen. Umfassende Bearbeitung hat dieser Gegenstand durch E. Abderhalden[3]) und seine Mitarbeiter gefunden, die durch Beobachtung des polarimetrischen Drehungsvermögens, die sog. optische Methode[4]), nachwiesen, daß ganz allgemein bei parenteraler Zufuhr von „körper-“ und „blutfremdem“ [Abderhalden 1906[5])] Material — wie Eiweißkörpern, Peptonen und Kohlenhydraten, speziell Rohrzucker[6]) — neue Fermente im Blutplasma bzw. -serum auftreten, die demselben, im Gegensatze zur Norm[7]), die Fähigkeit verleihen, diese künstlich eingebrachten Verbindungen zu spalten und dadurch ihres spezifischen Charakters zu berauben. Dieselben Veränderungen des Blutes ließen sich auch auf enteralem Wege, durch Überschwemmung des Darmkanals mit den betreffenden Nahrungsstoffen, herbeiführen. Diese Befunde illustrieren die Bedeutung der Verdauung als eines spezifisch antitoxischen Schutzprozesses, der zur Zerstörung der als Antigene wirkenden Bestandteile der Nahrung führt und das Eindringen „körper“- wie „blutfremder“ Stoffe verhindert bzw. die Verwertung von Abbauprodukten derselben ermöglicht — eine Rolle, die ebenso wie die spezifisch analytische, die spezifische Assimilation vorbereitende und die energetische bzw. thermogenetische Bedeutung der Verdauung erst im letzten Dezennium klar erkannt und formuliert wurde [L. Michaelis und C. Oppenheimer[8]),

[1]) Über das Auftreten von Invertin im Blut. Zeitschr. f. Biol. 47, 279 bis 288, spez. 280, 1906.

[2]) a. a. O. 1906.

[3]) Zusammenfassende Darstellung in „Schutzfermente des tierischen Organismus“. Berlin 1912.

[4]) E. Abderhalden, Med. Klin. 1909, Nr. 41; Centralbl. f. Physiol. 23, Nr. 25, S. 954 bis 955, 1909; Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 575, 1911.

[5]) Lehrbuch d. physiolog. Chem., S. 292. Berlin-Wien 1906.

[6]) E. Abderhalden und C. Brahm, Serologische Studien mit Hilfe der „optischen Methode“. VIII. Mitteil. Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 429 bis 432, 1910. — E. Abderhalden und G. Kapfberger, XI. Mitteil. Ebenda 69, 23 bis 49, 1910.

[7]) E. Heilner, Über das Schicksal des subcutan eingeführten Rohrzuckers im Tierkörper. Zeitschr. f. Biol. 56, 75 bis 86, 1911.

[8]) Über Immunität gegen Eiweißkörper. Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., Suppl.-Bd. 1907, S. 336 bis 366.

A. v. Tschermak[1]), Aufstellung des Begriffes „Schutzfermente" durch E. Heilner[2]), E. Abderhalden u. a.].

Meine Versuche betrafen die Bildung von Verdauungsfermenten bei längerdauernder enteraler, per os stattfindender Zufuhr gewisser Kohlenhydrate, die nicht typische Nahrungsbestandteile der betreffenden Tiere sind — nämlich Inulin und Lichenin. Mit Absicht wählte ich als Versuchstiere Herbivoren (Kaninchen), nicht Carnivoren (z. B. Hunde), da bei den ersteren eher die adaptative Bildung besonderer Kohlenhydratfermente zu erwarten war als bei den letzteren. Werden doch in der landwirtschaftlichen Praxis Topinamburknollen als Ersatz für Kartoffeln zur Fütterung von Kaninchen und Schweinen verwendet. Unter einer größeren Anzahl (31) Kaninchen wurde 12 Individuen neben Hafer ein wachsender Zusatz von Topinamburknollen, die mir Herr Siegfried Strakosch-Wien in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte, ferner 19 Individuen ein steigender Zusatz von sog. isländischem Moos (Cetraria islandica), das in erheblicher Menge im Semmeringgebiete vorkommt, dargeboten. Die Aufnahme von isländischem Moos in größeren Mengen wurde nur schwer erreicht. Bei dieser Fütterungsweise gingen die Tiere zum Teil früher oder später ein — auch infolge interkurrenter Krankheiten —, zum Teil überlebten sie und wurden zum Zwecke der Untersuchung nach bestimmter Zeit getötet. Andererseits wurden 9 Kaninchen als Kontrolltiere teils ausschließlich auf Hafer (6 Indiv.), teils auf Mischung von Hafer und Grünfutter (3 Indiv.) gesetzt. Nebenbei wurde 1 Kaninchen in die Untersuchung einbezogen, das spontan an dem für Katzen bestimmten gekochten Fleisch zu naschen begonnen hatte und dann durch 3 Wochen zu ausschließlicher Fleischnahrung gebracht worden war, wobei es schließlich an Darm- und Nierenentzündung einging.

In jedem Einzelfalle wurden aus der sorgfältig isolierten, mit Wasser gewaschenen Darmschleimhaut oder Pankreassubstanz der eben verendeten oder getöteten Tiere Glycerin-

---

[1]) Die neueren Anschauungen über Verdauung. Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 32, S. 1403 bis 1404.

[2]) Über die Wirkung großer Mengen artfremden Blutserums im Tierkörper nach Zufuhr per os und subcutan. Zeitschr. f. Biol. 50, 26 bis 37, 1907; vgl. auch 56, 75 bis 86, 1911.

extrakte bereitet und auf Spaltungswirkung gegenüber chemisch reinem Inulin und Lichenin in 3%iger Lösung geprüft. Da die Gegenwart von Glycerin, speziell auf gewissen Konzentrationsstufen, die Verwendbarkeit der Reduktionsproben vermindert oder aufhebt, beschränkte ich mich im wesentlichen auf die Gärungsprobe. Im speziellen wurden 15 ccm 3%iger Inulin- bzw. Licheninlösung mit 2 oder 5 ccm Extrakt versetzt und durch 24 oder 48 Stunden bei 38° gehalten. Die etwas eingeengte, mit Wasser auf 15 ccm ergänzte Flüssigkeit wurde der Gärprobe durch 24, 48 oder 96 Stunden unterworfen, da die Vergärung sehr langsam erfolgte.

Bezüglich der mit typischer, d. h. inulin- und licheninfreier Nahrung gefütterten Kontrolltiere ergab sich, daß in etwa der Hälfte der Fälle das Pankreas- oder Darmschleimhautextrakt keinerlei fermentative Spaltung von Inulin oder Lichenin zu vermitteln vermag. In der anderen Hälfte der Fälle besteht hingegen eine spurweise oder mäßige, ja in einem Einzelfalle selbst deutliche Wirkung dieser Art. Der Anschein eines solchen Effektes kann allerdings mitunter durch einen gelegentlichen spurweisen Zuckergehalt im Extrakte, der bei Verwendung gekochten Extraktes oder bei Vergärung des alleinigen Extraktes rein zutage tritt, hervorgerufen oder verstärkt sein. Kontrollproben ergaben jedoch, daß an dem gelegentlichen Vorkommen von Inulinase-Lichenase im Pankreas und in der Darmschleimhaut von inulin- und licheninfrei gefütterten Kaninchen nicht zu zweifeln ist. Allerdings ist dasselbe im allgemeinen recht beschränkt, so daß nach 24stündigem Digerieren die Vergärung von 3%iger Inulinlösung selbst in 4mal 24 Stunden kaum je eine höhere Menge von CO_2 liefert, als einer 0,3%igen Traubenzuckerlösung entspricht. Interessant ist ferner, daß in den positiven Fällen sowohl auf Inulin als auf Lichenin eine Wirkung besteht, die allerdings im Einzelfalle nicht immer gleich stark zu sein scheint.

Immerhin ist durch diese Eventualität die Untersuchung der eingangs formulierten Frage unter Verwendung von Inulin oder Lichenin an Kaninchen in sozusagen unerfreulicher Weise kompliziert. Über das Detail dieser ersten Versuchsreihe unterrichtet Tabelle I. In dieser sind folgende Bezeichnungen verwendet:

P = Pankreasextrakt;
D = Darmschleimhautextrakt;
∅ = keine CO_2-Entwicklung oder eine zweifelhafte, minimale Bläschen oder eine Blase von wenigen Millimetern Durchmesser ergebend, höchstens 0,03 % Traubenzucker entsprechend;
\+ = Spur von CO_2-Entwicklung, entsprechend Werten zwischen 0 (oder höchstens 0,03 %) und 0,1 % Traubenzucker;
++ = mäßige CO_2-Entwicklung, entsprechend jener von 0,1 bis 0,3 %iger Traubenzuckerlösung;
+++ = deutliche CO_2-Entwicklung, entsprechend jener von 0,3 bis 0,5 %iger Traubenzuckerlösung;
++++ = sehr deutliche CO_2-Entwicklung, entsprechend einer mehr als 0,5 %igen Traubenzuckerlösung;
$I \gtreqless L$ = Wirkung auf Inulin stärker, gleich, schwächer wie auf Lichenin.

Tabelle I.

Fütterung mit Nahrung ohne Inulin oder Lichenin.

Nr.	Prot.	Fütterungsweise	Fütterungsdauer	Herkunft des Extraktes	Gärungsprobe bzw. Gehalt an Inulinase — Lichenase	Zuckergehalt des Extraktes
1a	25	Hafer	8 Wochen	P	+++(I > L)	∅
1b	35	„	8 „	D	++(I > L)	+
2a	15	„	11½ „	P	∅	∅
2b	26	„	11½ „	D	∅	∅
3	11	„	15 „	P+D	++(I > L)	+
4	28	„	18 Monate	P+D	+(I > L)	..
5	31	„	viele „	P+D	∅	∅
6	32	„	„ „	P+D	++(I = L)	+
7	45	Gem. Futter	38 Tage	D	++(I > L)	+
8	52	„ „	5½ Monate	P	++	..
9	19	„ „	32 Wochen	D+P	∅	∅
10	48	Fleisch	3 Wochen	D	∅	∅

Die Untersuchung der auf inulinhaltige Nahrung gesetzten Tiere ergab, daß eine länger, d. h. 3 Wochen bis 6 Monate fortgesetzte Fütterung mit Topinamburknollen in der Regel (neben zehn positiven zwei negative Fälle) zum Auftreten bzw. zur Verstärkung von fermentativer

Inulinspaltung führt. Dieselbe vermag in einzelnen Fällen relativ hohe Grade zu erreichen — nach 48 stündigem Digerieren und 100 stündigem Gären bis zu einer CO_2-Entwicklung, die einer 0,8 %igen Traubenzuckerlösung entspricht —, wie sie bei inulinfrei gefütterten Kaninchen nicht zu beobachten sind. Immer bleibt jedoch die Inulinspaltung unvollständig. Das Pankreas scheint mehr Ferment zu bilden als die Darmschleimhaut. Auf Inulin wirksame Extrakte spalten auch Lichenin, allerdings nicht immer in demselben Betrage. Bezüglich der Details sei auf die nachstehende Tabelle II verwiesen.

Tabelle II.

Fütterung mit inulinhaltiger Nahrung (Topinambur).

Nr.	Prot.	Fütterungsdauer	Herkunft des Extraktes	Gärungsprobe bzw. Gehalt an Inulinase — Lichenase
1a	23	3 Wochen	P	+++ ($I \gg L$)
1b	3	3 "	D	++ ($I > L$)
2	53	3 "	P	∅
3	43	23 Tage	D	++ ($I = L$)
4a	46	4 Wochen	P	+ ($I = L$)
4b	47	4 "	D	+ ($I = L$)
5	38	1 Monat	P	+ ($I = L$)
6	39	5 Wochen	D	++ ($I > L$)
7a	17	5½ "	P	++++ ($I < L$)
7b	13	5½ "	D	∅
8a	54	6½ "	P	+
8b	1	6½ "	D	++
9a	4	15 "	P	∅
9b	20	15 "	D	∅
10	5	15 "	D	++ ($I = L$)
11	6	15 "	D	++
12	2	6 Monate	D	+

Die mit licheninhaltiger Nahrung gefütterten Kaninchen zeigten — analog den inulingefütterten — bei länger dauernder Zufuhr von sog. isländischem Moos (2 Tage bis 5 Monate) in der Regel (15 positive, 4 negative Fälle) **Auftreten oder Verstärkung von fermentativer Licheninspaltung.** Dieselbe erreichte in einzelnen Fällen hohe Grade (nach 48 stündigem Digerieren und 100 stündigem Gären bis zu einer CO_2-Entwicklung entsprechend 0,85 % Traubenzucker), blieb aber stets unvollständig. **Auf Lichenin wirksame Extrakte spalten auch Inulin,** und zwar bald stärker, bald

gleich, bald schwächer wie Lichenin selbst. Das Detail der Versuche verzeichnet Tabelle III.

Tabelle III.

Fütterung mit licheninhaltiger Nahrung (isländisches Moos).

Nr.	Prot.	Fütterungsdauer	Herkunft des Extraktes	Gärungsprobe bzw. Gehalt an Inulinase — Lichenase
1	22	2 Tage	D	∅
2	40	3 „	P	++ (I > L)
3	49	4 „	D	∅
4a	41	7 „	P	++ (I = L)
4b	21	7 „	D	+ (I > L)
5a	50	8 „	P	∅
5b	56	8 „	D	+
6a	51	10 „	P	∅
6b	58	10 „	D	+ (I = L)
7	42	11 „	P	++ (I < L)
8	33	16 „	P + D	++ (I < L)
9a	55	27 „	P	∅
9b	9	27 „	D	∅
10	30	28 „	P + D	+ (I > L)
11a	14	31 „	P	++ (I > L)
11b	10	31 „	D	++++ (I ⩾ L) (mit Spur Zucker im Extrakt)
12a	57	$4^1/_2$ Wochen	P	∅
12b	12	$4^1/_2$ „	D	+ (I < L)
13	29	33 Tage	P + D	∅
14	44	7 Wochen	P	++ (I > L)
15	24	8 „	P + D	+++ (I ⩽ L)
16	27	67 Tage	P + D	+ (I < L)
17	18	mehrere Monate	P + D	+ (I > L)
18a	16	5 Monate	P	++ (I > L)
18b	7	5 „	D	+
19	8	5 „	D	+

Nach den angeführten Versuchen ist an dem Vorkommen einer adaptiven Fermentbildung bei länger dauernder enteraler Zufuhr atypischer Kohlenhydrate wie Inulin und Lichenin nicht zu zweifeln. Das Sekret bzw. das Glycerinextrakt des Pankreas und der Darmschleimhaut vermag also die Fähigkeit zu gewinnen, Inulin und Lichenin in gewissem, allerdings beschränktem Ausmaße fermentativ in gärfähigen Zucker zu spalten. Hierdurch waren die Tiere, die positive Reaktion ergaben, instand gesetzt, das Inulin oder Lichenin ihrer Nahrung fermentativ zu verarbeiten und zu verwerten. Daß überdies eine nicht-fermentative Verwertung von

Inulin, nämlich durch die Salzsäure des Magensaftes erfolgt, ist nach den Feststellungen von B. H. Chittenden[1]) und E. Weinland[2]) anzunehmen.

Allerdings erscheint die Möglichkeit wie auch die Bedeutung des obigen Nachweises dadurch einigermaßen eingeschränkt, daß schon bei typisch gefütterten Kaninchen in etwa der Hälfte der Fälle Inulinase-Lichenase im Pankreas und in der Darmschleimhaut nachweisbar ist. Andererseits tritt die Anpassung nicht bei jedem Individuum ein oder ist nur sehr geringen Grades, wie sie überhaupt recht ungleichmäßig zu sein scheint. Ein solches Verhalten ist allerdings überhaupt bei so manchen Anpassungsvorgängen festzustellen. Nicht wenige als adaptativ[3]), d. h. ganz besonderen äußeren Bedingungen entsprechend oder korrespondent erscheinende Leistungen treten nämlich an einzelnen Individuen mehr oder weniger deutlich schon unter normalen Bedingungen zutage; diese Individuen verraten sozusagen durch spontane Variation die im Prinzip bestehende Anlage zu einer adaptativen Abänderung nach bestimmten Richtungen. Auch die erhebliche Verschiedenheit der einzelnen Individuen im Anpassungsgrade, die bis zu vollem Refraktärverhalten heruntergehen kann, ist eine nach sonstigen Erfahrungen auf diesem Gebiete wohlbekannte Erscheinung. Angesichts dieses Umstandes wie mit Rücksicht auf den verschiedenen Artcharakter der Versuchstiere ist es nicht unbegreiflich, daß E. Weinlands Versuche mit Inulinzufuhr an Hunden negativ blieben, während meine Experimente an Kaninchen ein überwiegend positives Ergebnis hatten.

Des weiteren sei hervorgehoben, daß die adaptative Fermentbildung auf Inulin- oder Licheninfütterung keine engspezifische ist, so daß etwa im ersteren Falle eine auf Lichenin unwirksame Inulinase produziert würde und umgekehrt. Vielmehr erweist sich ein bei Topinamburfütterung erhaltenes, auf Inulin wirksames Extrakt, sei es aus Pankreas oder aus Darmschleimhaut gewonnen, stets auch auf Lichenin wirksam. Ebenso

---

[1]) Americ. Journ. of Physiol. 2, XVII—XVIII (Proc. Americ. Physiol. Soc.) 1898.

[2]) a. a. O. 1906, S. 286, Anm. 1.

[3]) Vgl. die Analyse des Anpassungsbegriffes, wie ich sie a. a. O. 1900 und 1904 gegeben habe.

gilt das Umgekehrte. Auch die von typisch gefütterten Tieren gewonnenen Extrakte sind, wenn überhaupt wirksam, auf beide Substrate eingestellt. Der Wirkungsgrad auf beide Substrate ist allerdings nicht immer gleich, ja es können sogar erhebliche Unterschiede vorkommen, und zwar sogar in der Art, daß mitunter ein bei Inulinfutter gewonnenes Extrakt Lichenin stärker angreift als Inulin selbst — so in Versuch 7a von Tabelle II. Analoges ist mitunter bei Licheninfütterung zu beobachten, so in Versuch 2, 11, 14, 18a von Tabelle III.

Ein solches Verhalten könnte zur Annahme führen, daß in jedem positiven Einzelfalle zweierlei Fermente abgesondert würden, deren Produktion korrelativ verknüpft wäre, ohne absolut parallel zu gehen — nämlich eng-spezifische Inulinase und eng-spezifische Lichenase in varianten relativen Mengen. Eine Nötigung zu einer solchen verhältnismäßig komplizierten Vorstellung besteht jedoch nicht. Es mag sehr wohl ein einziges Ferment von weiterer Spezifizität, was das Substrat anbelangt, eine Inulo-Lichenase in Frage kommen, deren Wirkung auf Inulin an andere fördernde oder hemmende Bedingungen geknüpft ist als die Wirkung auf Lichenin. Durch die im Extrakt enthaltenen Beimengungen könnte der Wirkungsgrad auf Inulin und jener auf Lichenin in einzelnen Fällen verschieden gestaltet werden. Eine solche Vorstellung findet eine gewisse Analogie in dem differenten Einfluß von Salzen auf die peptische und die chymotische Wirkung des Magensaftes, deren prinzipielles Parallelgehen J. P. Pawlow und S. W. Parastschuk[1]) auf das exakteste nachgewiesen haben. Die zunächst anzunehmende adaptative Bildung einer Inulo-Lichenase von weiterer Spezifizität steht ferner in Parallele zum Auftreten adaptativer oder reaktiver Schutzfermente von weiterer Spezifizität im Blute nach Injektion artfremder Kohlenhydrate. So fand E. Abderhalden[2]), daß nach Zufuhr von gelöster Stärke oder Milchzucker das Plasma bzw. Serum die Fähigkeit gewinnt, auch Rohrzucker zu spalten.

---

[1]) Über die einem und demselben Eiweißfermente zukommende proteolytische und milchkoagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 415 bis 452, 1904.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 429 und 69, 23, 1910, sowie Schutzfermente S. 65.

Über die Art des Zustandekommens der adaptativen Fermentbildung bei enteraler Zufuhr lassen sich bisher nur allgemeine Vermutungen aufstellen, von deren Formulierung ich hier zunächst absehe. Dabei muß der Umstand berücksichtigt werden, daß die Bildung der typischen Verdauungsfermente nicht erst durch enterale Zufuhr von Nahrungsmitteln nach der Geburt als Anpassungsreaktion ausgelöst wird, sondern schon in gewissen Stadien des Embryonallebens beginnt, dann allerdings in der Periode der selbständigen Nahrungsaufnahme sich anpassungsweise abstuft. Ein solches Verhalten gilt überhaupt für die meisten „zweckmäßig“ erscheinenden Einrichtungen des tierischen Organismus, deren zweckmäßige Grundlegung sozusagen prospektiv ohne ursachegebende Mitwirkung äußerer Faktoren erfolgt, deren Ausgestaltung hingegen adaptativ durch den Gebrauch bzw. in Anpassung an bestimmte äußere Faktoren geschieht. Nicht selten bezeichnet man sowohl die primäre Grundlegung als die sekundäre Ausgestaltung unklarer Weise als „angepaßt“ oder gar unzutreffend als „Anpassung“[1]).

[1]) Vgl. meine bezüglichen Ausführungen a. a. O. 1904.

Über den Einfluß der Digitaliskörper auf die Kurve des Elektrokardiogramms.

Von

A. Bickel und A. Tsividis.

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Königl. pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 6. August 1912.)

Mit 3 Tafeln.

In ihrem im Jahre 1910 erschienenen Buche über das Elektrokardiogramm teilen F. Kraus und Nicolai[1]) bereits Kurven mit, die sie von unter Digitaliswirkung stehenden Herzen erzielt haben. In ausführlicher Weise beschäftigte sich dann später Selenin[2]) mit diesem Gegenstande und leitete aus seinen Beobachtungen eine neue Theorie über das Wesen des Elektrokardiogramms her. Indessen betreffen die bislang vorliegenden Beobachtungen entweder den Zustand der chronischen Digitaliswirkung oder befassen sich, wie die Versuche von Selenin, vor allem mit dem Bilde, das das toxische Stadium der Digitalisvergiftung darbietet.

Jedenfalls bedürfen diese und die mit ihnen in Beziehung stehenden Fragen noch weiterer experimenteller Durcharbeitung, und so stellten wir uns die Aufgabe, den Einfluß der akuten Digitaliswirkung, wie sie nach der intravenösen Digitalisinjektionen auftritt, auf den Ablauf des Elektrokardiogramms zu studieren.

Nachdem Focke[3]) neuerdings wieder gezeigt hat, daß für die Digitalistherapie eigentlich nur die komplexe Droge oder ein aus ihr bereitetes vollwertiges Extrakt, das möglichst sämt-

---

[1]) Das Elektrokardiogramm des gesunden und kranken Menschen. Leipzig 1910.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. 143, 1911.

[3]) Therapie der Gegenwart 1912.

liche Stoffe der Folia digitalis besitzt, in Frage kommt, und daß die verstümmelten Digitalisauszüge wie z. B. das Digipuratum u. a. keinen Sinn haben, haben wir uns bei unseren Versuchen lediglich mit einem derartigen Extrakt befaßt, nämlich dem von Focke titrierten Digitalysatum Bürger. Wir wählten dieses Digitalysat und nicht ein Blätterinfus, weil wir für unsere Vergleichsversuche mit verschiedenen Dosierungen ein Präparat benötigten, auf dessen gleichmäßigen Gehalt an wirksamen Stoffen wir uns verlassen konnten.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen. Die Ableitung wurde bei der Aufnahme des Elektrokardiogramms vom Oesophagus und Mastdarm aus vorgenommen. Die Substanz wurde in die Ohrvene injiziert.

Zunächst orientierte uns eine Aufnahme des Carotispulses und Druckes mit Hilfe des Gad-Cowlschen Tonometers am Kymographion über die Geschwindigkeit des Eintritts der Digitaliswirkung nach der intravenösen Injektion des Dialysats in die Ohrvene.

Versuch: Ein 1800 g schweres Kaninchen erhält, nachdem der Puls in der Norm (Kurve 1) aufgenommen war, 1 ccm Digitalysat pro Kilo Körpergewicht in die rechte Ohrvene injiziert. Unmittelbar nach der bei XX auf Kurve 2 erfolgenden Injektion erhebt sich nach einer initialen Senkung der Druck, die Pulsamplitude wird größer und die Schlagfolge verlangsamt sich. Diese Drucksteigerung mit der Bradycardie bleibt einige Zeit bestehen. Dann sinkt, wie die Kurven 3 und 4 zeigen, der Druck, aber die Pulsamplitude bewahrt ihre Größe und die Bradycardie dauert fort.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß man bei der Dosierung von 1 ccm pro Kilogramm Kaninchen eine kräftige und nachhaltige Herzwirkung erhält. Für unsere elektrokardiographischen Beobachtungen wählten wir nun Dosierungen, die teils niedriger, teils höher waren, als die hier angewandten. Wir verwandten nämlich 0,7 bis 2 ccm Digitalysatum Bürger pro Kilogramm Kaninchen.

Vor, unmittelbar nach und endlich in bestimmten Intervallen nach der Injektion des Arzneimittels wurde die elektrokardiographische Kurve mit dem Apparat von Bock-Thoma aufgenommen.

Tabelle I.

Kaninchen von 1800 g erhält 0,7 ccm pro Kilogramm Körpergewicht.

Zackenhöhe mm	Vor Injektion	5′ nach Injektion	25′ nach Injektion	45′ nach Injektion	65′ nach Injektion
J	?	5	4,5 bis 5,5	5 bis 6	5
J_p	?	6 bis 7	7	6 „ 7,5	6
A	4,5	3	4 bis 5	5 „ 6	3,5
F	4	4	4	5 „ 6	3,5
Herzphase in $^1/_{10}''$	$3^3/_4$	4	$5^3/_4$	3	$2^1/_2$
Herzpause in $^1/_{10}''$	1	2	2	$1^1/_2$	$1^1/_4$

Resultat: Vergrößerung der Herzphase (Beginn der A-Zacke bis Ende der F-Zacke); Vergrößerung der Pause (vom Ende der F-Zacke bis zum Anfang der A-Zacke); Vergrößerung von F, weniger von A; Verhalten von J und J_p unsicher, wegen Fehlens der Anfangswerte.

Tabelle II.

Kaninchen von 2000 g erhält 0,9 ccm pro Kilogramm Körpergewicht.

Zackenhöhe mm	Vor Injektion	15′ nach Injektion	50′ nach Injektion	100′ nach Injektion
J	6 bis 6,5	6 bis 6,5	8,5 bis 9	8,5 bis 9
J_p	5,5	5 „ 5,5	8 „ 8,5	8 „ 8,5
A	3 bis 3,25	4 „ 4,5	5	5 „ 5,5
F	angedeutet	angedeutet	2 bis 2,5	2
Herzphase in $^1/_{10}''$	$2^3/_4$	3	$3^1/_2$ bis $3^3/_4$	3
Herzpause in $^1/_{10}''$	1	1	$1^1/_4$ „ $1^1/_2$	$1^1/_2$

Resultat: Vergrößerung von Herzphase und -pause; Vergrößerung von F, A, J, J_p.

Tabelle III.

Kaninchen von 2000 g erhält 1,25 ccm pro Kilogramm Körpergewicht.

Zackenhöhe mm	Vor Injektion	45′ nach Injektion
J	8 bis 8,5	7,5 bis 8
J_p	5,5 „ 6,5	5 „ 6
A	4,5 „ 5	4,5
F	2,5 „ 3	3
Herzphase in $^1/_{10}''$	$2^3/_4$	$3^1/_2$ bis $3^3/_4$
Herzpause in $^1/_{10}''$	1	$1^1/_2$

Resultat: Vergrößerung von Herzphase und -pause. Sämtliche Zacken nicht wesentlich verändert.

Tabelle IV.

Kaninchen von 1900 g erhält 1,5 ccm pro Kilogramm Körpergewicht.

Zackenhöhe mm	Vor Injekt.	1′ nach Injekt.	10′ nach Injekt.	15′ nach Injekt.	30′ nach Injekt.	60′ nach Injekt.
J	7 bis 8	6 bis 7,5	6	6	7,5 bis 8,5	7
J_p	5,5 „ 7,5	5 „ 7	5,5	5,5	5,5 „ 6,5	4 bis 5
A	5	4,5	3,5	3,5	3 „ 4	4
F	5	5	4	4	4	4
Herzphase in $^1/_{10}''$	$3^1/_2$	$3^1/_2$	$3^2/_3$	$3^1/_3$	$4^1/_2$	5
Herzpause in $^1/_{10}''$	$1^1/_4$	$1^1/_4$	$1^2/_3$	$1^1/_3$	$2^1/_4$	2

Resultat: Vergrößerung von Herzphase und -pause. F- und A-Zacke werden kleiner, ebenso J_p. J wird zunächst kleiner, später vorübergehend größer und dann wieder kleiner.

Tabelle V.

Kaninchen von 2200 g erhält 2 ccm pro Kilogramm Körpergewicht.

Zackenhöhe mm	Vor Injekt.	1′ nach Injekt.	10′ nach Injekt.	25′ nach Injekt.	45′ nach Injekt.	60′ nach Injekt.	85′ nach Injekt.
J	5,5	5	5	5	4,5 bis 5	4,5	4
J_p	5 bis 6	5	4,5 bis 5	5	4,5 „ 5	4,5	4,5
A	5	4	4	4	4	3	3,5
F	5	4	4,5	4	4	2,5 bis 3	3
H.-Phase i. $^1/_{10}''$	$2^3/_4$	$3^1/_2$	$3^1/_4$	$3^1/_4$	$3^1/_4$	$2^3/_4$	$3^1/_4$
H.-Pause i. $^1/_{10}''$	1	$1^1/_2$	$1^1/_3$	$1^1/_3$	$1^1/_4$	1	$1^1/_3$

Resultat: Vergrößerung von Herzphase und -pause. Verkleinezung aller Zacken, besonders aber der F- und A-Zacke.

Aus allen diesen Beobachtungen geht hervor, daß kleine und mittlere Dosen — bis etwa 1 ccm Digitalysatum Bürger — pro Kilogramm Körpergewicht beim Kaninchen eine Tendenz der Zacken zur Vergrößerung bedingen. Daß davon auch die F-Zacke nicht ausgenommen ist, erscheint im Hinblick darauf bemerkenswert, als man ja vielfach aus der Größe der F-Zacke Rückschlüsse auf die Herzkraft zu ziehen geneigt ist. Bei größeren Digitalisdosen hingegen sehen wir ein umgekehrtes Bestreben Platz greifen: die Zacken werden kleiner, A, J und J_p, vor allem aber auch F. Diese Verkleinerung braucht genau wie die Vergrößerung nicht kontinuierlich fortzuschreiten,

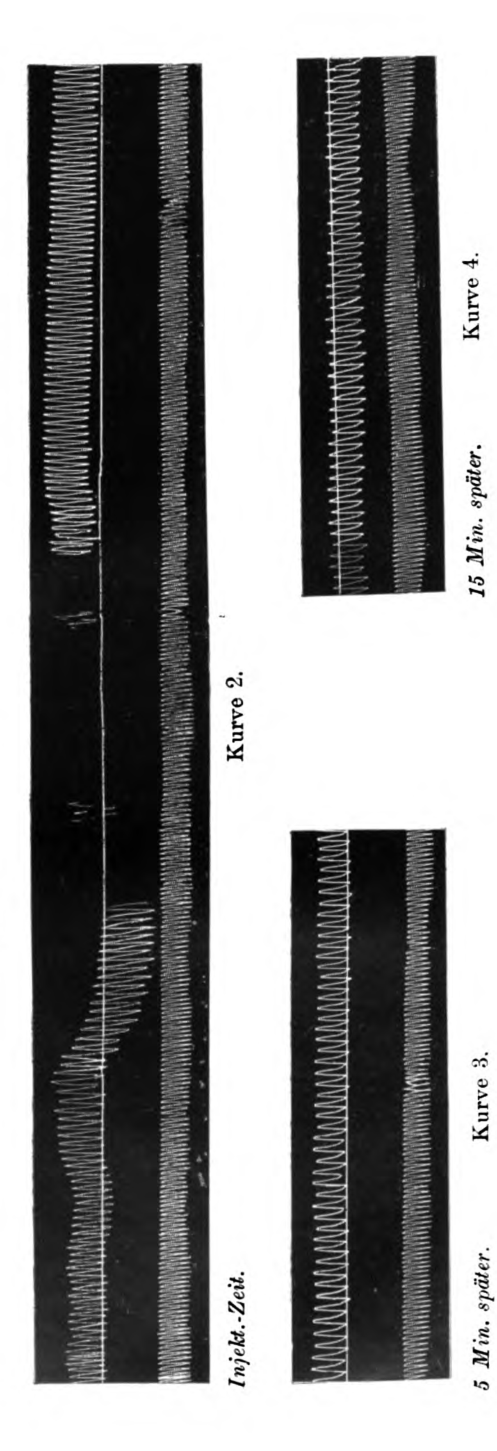
sondern kann durch vorübergehende Schwankungen unterbrochen sein. Unabhängig von diesen Veränderungen in der Zackenhöhe, die bald in dem, bald in jenem Sinne sich vollzieht, je nach der Größe der Dosis des Medikamentes, beobachten wir unter allen Umständen die Verlängerung der Herzphase und der Herzpause, und es erscheint bemerkenswert, daß die erstere darin die letztere in der Regel übertrifft.

Einige Reproduktionen von Originalkurven des Elektrokardiogramms mögen die vorstehenden Ausführungen noch weiter erläutern. (Tafel I/III.)

Digitalysatum (Burger).
Kaninchen 1800 g. Intrav. 1,8 ccm.



Normal. Kurve 1.

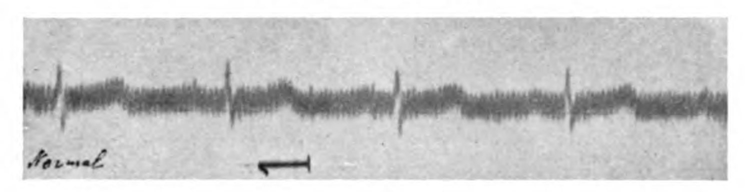


Injekt.-Zeit. Kurve 2.

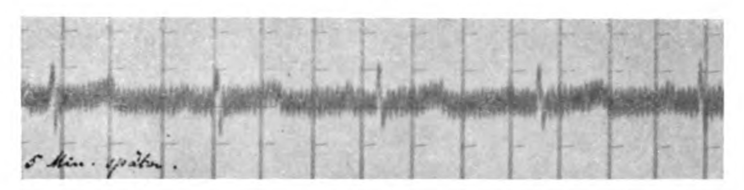
5 Min. später. Kurve 3.

15 Min. später. Kurve 4.

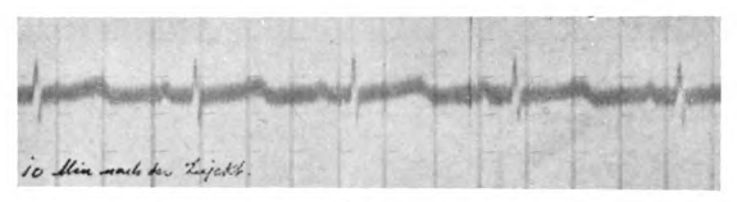
Elektrokardiogramm I.
Kaninchen 1950 g. Intrav. Injekt. 3 ccm. Versuch I.
Digitalysatum (Burger).



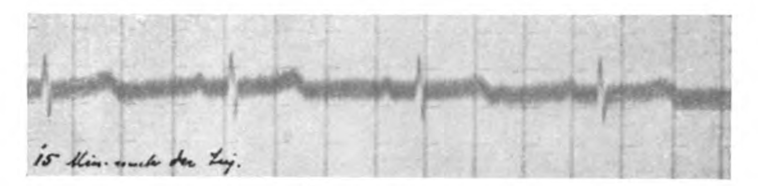
Nr. 1.



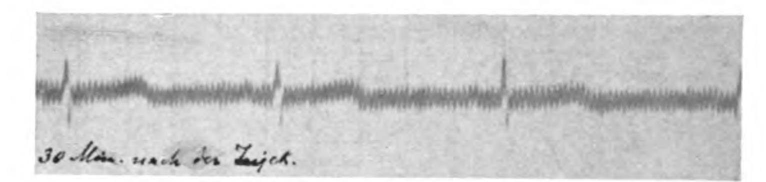
Nr. 2.



Nr. 3.



Nr. 4.

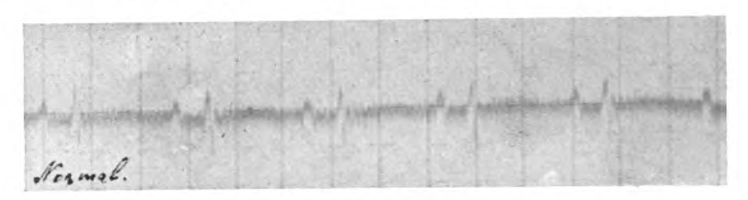


Nr. 5.

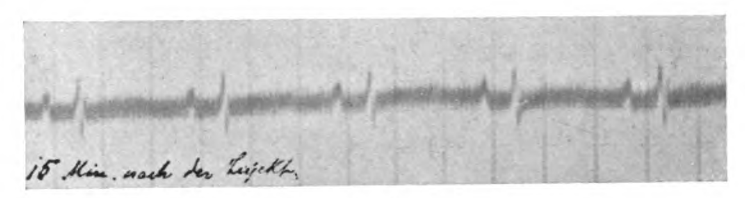


Nr. 6.

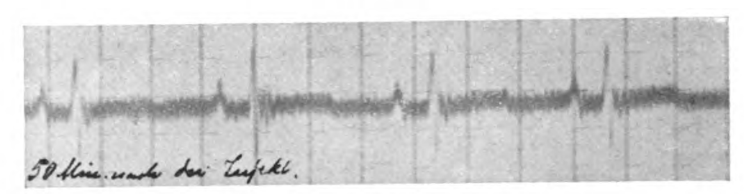
Elektrokardiogramm II.
Kaninchen 750 g. Digitalysatum intrav. 2 ccm. Versuch II.



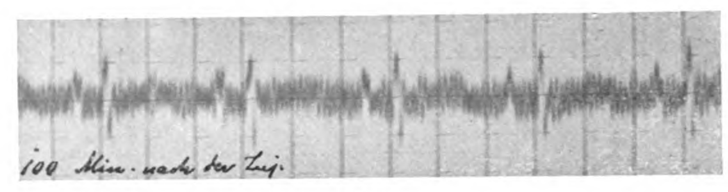
Nr. 1.



Nr. 2.

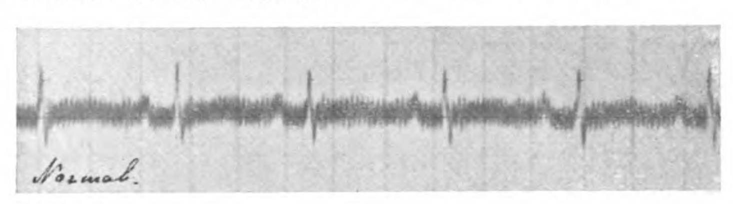


Nr. 3.



Nr. 4.

Elektrokardiogramm III.
Kaninchen 2000 g. Digitalysatum intrav. 2,5 ccm. Versuch III.







Zur Lehre vom Fettstoffwechsel.

Von

Ernst Freudenberg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 7. August 1912.)

Für die Grundfragen des Fettstoffwechsels trifft heute noch die Bemerkung Mieschers[1]) zu, daß unser Wissen um sie sehr beschränkt ist. Es sind das die Fragen: 1. In welcher Art erfolgt der Fettansatz bei reichlicher Zufuhr von Fett oder Fettbildnern? 2. Wodurch wird die Fettwanderung im Hunger bewirkt?

Rosenfeld[2]) hat die energetische Betrachtungsweise auf bestimmte Fälle des gesteigerten Fetttransportes angewendet, indem er ausführte, daß die Zelle zur Aufrechterhaltung oder Vermehrung der Oxydationen beim Mangel an anderen Sparmitteln (Kohlenhydrat, Eiweiß) das Fett dem Blute entnimmt und dafür Fett aus den Depots ins Blut nachrückt. Diese Betrachtungsweise vermag jedoch die Frage, was eigentlich zum Austritt des Fettes aus den Zellen der Depots führt, nicht zu beantworten.

Einen Fortschritt bedeuten hier die Untersuchungen von Kastle und Loevenhart[3])[4]), mit denen J. Loeb[5]), den Fettstoffwechsel vom Gesichtspunkt der umkehrbaren Lipasewirkung betrachtet. Überwiegt die synthetische Phase der Lipase-

---

[1]) Miescher, Histochem.-physiol. Untersuchungen. Leipzig 1897.

[2]) Rosenfeld, Ergebn. d. Physiol. **1**, 1. Abt., S. 651, 1902; **2**, 1. Abt., S. 50, 1903.

[3]) Kastle und Loevenhart, Americ. Chem. Journ. **24**, 491, 1900.

[4]) Loevenhart, Americ. Journ. of Physiol. **6**, 331, 1902.

[5]) Loeb, Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen. Leipzig 1906, S. 21 ff.

wirkung über die hydrolytische, so erfolgt Fettansatz, im anderen Falle Fettschwund. Ersteres ist dann der Fall, wenn die aus der Nahrung stammenden Fettsäuren bzw. Seifen in die Gewebe übertreten. Bleibt der Zufluß aus, so sind die Bedingungen für die Spaltung des Fettes in den Zellen gegeben.

Hiermit wäre das Problem des Fettstoffwechsels noch nicht vollständig geklärt. Chylus und Blut enthalten nämlich selbst nach Fütterung mit Fettsäuren als solchen ganz überwiegend Neutralfett[1]). Es ist kaum anzunehmen, daß das Neutralfett als solches in die Zellen eintritt, es würde denn mechanisch wie bei den Phagocyten vom Protoplasma aufgenommen. Die Natur der Membran der Fettzellen, die man sich nur wasserdurchtränkt vorstellen kann, schließt eine Filtration und Diffusion des Neutralfettes aus Blut und Lymphe ins Zellinnere aus. Es bleibt zunächst nur übrig anzunehmen, daß der Aufnahme eine neuerliche Verseifung vorangeht, worauf im Zellinnern dann wieder eine Resynthese erfolgt. Danach wäre zu erwarten, daß im Blut, der Lymphe und der Gewebsflüssigkeit der Reservestoffbehälter eine fettspaltende, in den fettspeichernden Zellen aber eine fettsynthetisierende Wirkung anzutreffen wäre, womit nicht ausgeschlossen wäre, daß es sich an beiden Orten um die reversible Wirkung derselben Lipase handelte.

Abgesehen davon, daß für alle diese Annahmen die Beweisführung aussteht, bedürfen die oben genannten Untersuchungen insofern einer Ergänzung, als sie mit Äthylbutyrat als Fett angestellt sind. Die Ester der niederen Fettsäuren werden aber bekanntlich auch von anderen Reagenzien als Fermenten viel leichter verseift als die der höheren. Nach Terroine[2]) ist Leberextrakt, das die Ester der niedrigen Säuren energisch zerlegt, schon den Laurin- und Myristinsäureestern gegenüber wirkungslos.

Aufgabe der nachstehenden Untersuchungen war es daher, zunächst festzustellen, ob und wieweit eine Spaltung des Gewebsfettes verschiedener Organe bzw. denselben zugesetzten natürlichen Fettes sich in vitro nachweisen läßt.

---

[1]) Immanuel Munck, Virchows Archiv 95, 407, 1884.

[2]) Terroine, Journ. de Physiol. et de Pathol. générale 13, 1911.

Methodik.

Der Nachweis der Spaltung echter Fette durch die tierischen Gewebe wurde meist nur durch den Aciditätszuwachs des Digestionsgemisches geführt[1][2]), ein Verfahren, auf dessen Unsicherheit auch Saxl[3]) hinweist.

In meinen Versuchen wurde nur die Acidität des petrolätherlöslichen Anteils der Organe bestimmt. Um diesen zu erhalten, wurde 24 Stunden mit kaltem, 3 bis 4 Stunden mit siedendem Alkohol, schließlich noch einige Stunden mit Petroläther extrahiert. Der Alkohol wurde abdestilliert, und die Rückstände nach dem Trocknen auf dem Wasserbade, wobei sich die flüchtigen Fettsäuren bis auf geringe Mengen verflüchtigen, mit Petroläther ausgezogen. Durch Schütteln der vereinigten Petrolätherextrakte mit Wasser zu wiederholten Malen werden diese von in Wasser löslichen niederen Säuren völlig gereinigt und zuletzt mit 80%-alkoholischer $^1/_5$ oder $^1/_{10}$ n-KOH gegen Phenolphthalein als Indicator austitriert. Zur Bestimmung der etwa in Form von Seifen vorhandenen Fettsäuren wurden die gesamten Rückstände mit heißem Wasser behandelt, dieses angesäuert, gegen Petroläther geschüttelt und auch letzterer titriert. Die Menge der so aus Seifen erhaltenen Fettsäuren war jedoch, da stärker alkalische Reaktion vermieden wurde, äußerst geringfügig und konnte teilweise vernachlässigt werden.

1. Fettspaltung im Fettgewebe.

Schätzt man den Umfang der Fettspaltung nach den beim Hungertier vorliegenden Verhältnissen, so ergibt sich, daß man beim überlebenden Fettgewebe keine intensive Spaltung erwarten kann.

Bei einem Kaninchen von ca. 2000 g schwindet das Fett der Depots im Unterhautgewebe und im Netz, das ungefähr 100 g betragen mag, in 8 bis 10 Hungertagen größtenteils. Dem entspricht eine tägliche Zersetzung von etwa 10 g Fett. Also würden pro 1 g Fett und Tag ca. 0,1 g = 10% zersetzt

---

1) Sieber, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 1908.

2) Fiessinger et Marie, Compt. rend. Soc. Biol. 67, 1909.

3) Saxl, diese Zeitschr. 12, 343, 1908.

werden. Dies sind 0,09 g Fettsäure[1]), entsprechend 1,6 ccm $^1/_5$ n-KOH. Einen viel höheren Wert wird man beim 24stündigen Digestionsversuch von 1 g Fett nicht erwarten dürfen. Versuche in dieser Richtung haben nur Zahlen geliefert, die diesen Wert nicht annähernd erreichten. Ich brachte frisch entnommene zerkleinerte Fettstückchen von 0,5 bis 1 g in Ringerlösung und verglich nach 7 bis 12stündiger Aufbewahrung bei Bruttemperatur ihren Fettsäuregehalt mit zu Beginn des Versuches untersuchten oder gekochten kleinen Stücken. Trotz verchiedener Variationen der Versuchsbedingungen (schwach saure Reaktion, kurze Einwirkung von Säure mit nachträglicher Entfernung, Luftdurchleitung, Verwendung von mit Quarz zerriebenem Fettgewebe) gelang es nicht, irgend erhebliche Spaltung zu erhalten. Auch Zusatz von Serum normaler oder im Hungerzustand befindlicher Tiere ändert hieran nichts[2]).

Da nicht auszuschließen war, daß die Verwendung von Ringerlösung die Bedingungen der Fettspaltung ungünstig beeinflußt, wurden Versuche mit aseptischer Autolyse vorgenommen. Es sei von vornherein bemerkt, daß diese mir von Prof. Hofmeister vorgeschlagene Versuchsanordnung sich überhaupt für den Nachweis der Lipasewirkung jeder anderen bei weitem überlegen erwiesen hat. Es scheint, daß Zusätze irgendwelcher Art namentlich von Antisepticis die Lipasewirkung tiefgreifend schädigen.

Versuch 32.

Gut genährter Hund wird in Chloroformnarkose durch Entbluten getötet. Sofort nach dem Tode wird das Abdomen unter aseptischen Kautelen eröffnet und es werden 3 fettreiche Stücke (von 20 bis 30 g) aus dem großen Netz entnommen und direkt in sterile 5 ccm weite Eprouvetten mit Watteverschluß gebracht. Eine Probe (1) wird sogleich für einige Minuten ins kochende Wasserbad gestellt. Hierauf werden alle 3 bei 38° $3^1/_2$ Tage im Brutschrank aufbewahrt, dann eine gewisse Zeit im Soxhletapparat extrahiert, die Extrakte genau gewogen, in Petroläther aufgenommen, mit Wasser geschüttelt und titriert.

---

[1]) Der Vergleichbarkeit wegen nehme ich hier wie auch in den späteren Ausführungen an, daß das Neutralfett aus Tristearin besteht.

[2]) Doch mag erwähnt werden, daß von 8 Hungerseris eines (Versuch 7) beträchtlichere Fettspaltung (Auftreten von 119 bis 125 mg Fettsäure in 3 Proben bei 7stündiger Versuchsdauer und Luftdurchleitung) zeigte.

Versuchs-Nr.	Extrakt gewogen g	Titriert: $^1/_5$ n-KOH ccm	Entsprechend Stearinsäure g	Abspaltung %
1	11,1512	0,7	0,0398	0,36
2	12,7241	2,2	0,1250	0,98
3	11,6195	2,35	0,1335	1,15

Es hat also in $3^1/_2$ Tagen eine Spaltung von etwa $^3/_4$ % stattgefunden.

Versuch 37.

Gut genährter Hund in Narkose durch Entbluten getötet. Es werden unter aseptischen Maßnahmen 2 Stücke aus dem Netze von 16,1 und 19,4 g entnommen, das erstere für 10 Minuten aufs kochende Wasserbad gebracht (1). Beide Proben werden 3 Tage bei 40° aufbewahrt und wie oben verarbeitet[1]).

Versuchs-Nr.	Extrakt gewogen g	Titriert: $^1/_{10}$ n-KOH ccm	Entsprechend Stearinsäure g	Abspaltung %
1	9,7061	1,4	0,0398	0,43
2	7,8205	3,1	0,0880	1,18

Es hat demnach in 3 Tagen eine Spaltung von $^3/_4$ % stattgehabt. Der Nachweis einer Fettspaltung innerhalb kürzerer Zeiten, der in der Weise versucht wurde, daß aseptisch entnommene Netzstücke in sterile Kochsalzlösung mit 0,2% Sodazusatz gebracht und im Wasserbad bei 40° durch Motorkraft gelind geschüttelt wurden, gelang nicht. Die Untersuchung der NaCl-Lösung auf gebildete Seifen nach 4, 6 und 8 Stunden ergab zwar davon geringe Mengen, jedoch mit zunehmender Zeitdauer keine entsprechende Zunahme daran.

Der in den mehrtägigen Versuchen gefundenen Spaltung kann allerdings in quantitativer Hinsicht keine größere physiologische Bedeutung beigemessen werden.

Ich habe oben erwähnt, daß beim Hungerkaninchen der tägliche Verbrauch an Fett ca. 10% des Vorrates betragen dürfte und daß die im Kaninchenfettgewebe nachweisbare

[1]) Es sei betont, daß in diesen 2 Versuchen wie auch in den späteren keine Entwicklung von niederen Organismen in Form von Kolonien vorhanden war, und daß sich auch sonst keine Anzeichen von Fäulnis oder Gärung zeigten.

Fettspaltung dahinter zurückbleibt. Ähnliches ergibt eine Betrachtung der beim Hund gegebenen Verhältnisse. Ein wohlgenährter Hund von 5 kg besitzt in seinen Fettpolstern hoch angenommen 500 g Fett. Einer der oben gefundenen Zahl entsprechenden täglichen Fettsäureabspaltung von 0,25% würde ein Freiwerden von nur $1^1/_4$ bis $1^1/_2$ g Fettsäure, also eine Zerlegung von wenig mehr als 1 g Fett in 24 Stunden entsprechen. Eine derartige Fettmobilisierung könnte die Bedürfnisse eines hungernden Hundes natürlich in keiner Weise bestreiten. Es ist allerdings zu bedenken, daß die ungünstigen postmortalen Bedingungen (Verbleiben der gebildeten Säure in der Zelle) möglicherweise keine intensive Spaltung gestatten und daß beim Hungertier vielleicht noch unbekannte, die Fettspaltung begünstigende Bedingungen dazutreten. Die Untersuchung von Fettstückchen hungernder Kaninchen gab allerdings keine höheren Zahlenwerte.

2. Fettspaltung in der Leber.

Daß in der Leber und in anderen Organen nach dem Tode eine Vermehrung der freien Fettsäuren stattfindet, hat als Erster wohl Lüdy[1]) gezeigt, doch ist sie nach diesem Autor nicht bedeutend. Seine Befunde wurden von anderen Autoren bestätigt [Saxl[2]), Ramond[3]), Sieber[4])].

Die Frage, ob Lebergewebe — oder auch anderes Gewebe, abgesehen vom Pankreas — zugesetztes natürliches Fett zu spalten vermöge, kann nach den bisherigen Untersuchungen nicht als entschieden gelten[5]).

Es wurden zunächst folgende orientierende Versuche angestellt.

Leberstücke zweier frisch getöteter Hunde werden mit etwas Quarzsand zerrieben, je 2 Portionen des Breies auf Dezigramme abgewogen, in 30 ccm einer Lösung von 0,9% NaCl und 0,1% Soda aufgeschwemmt und je eine Probe kurze Zeit aufs kochende Wasserbad gestellt. Nach Zusatz von 2 ccm Toluol werden die Proben gut durchgeschüttelt und für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

---

1) Lüdy, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 25, 347, 1889.
2) Saxl, a. a. O.
3) Ramond, Compt. rend. 48, 925.
4) Sieber, a. a. O.
5) Vgl. Röhmann, Biochemie, S. 95. Berlin 1908.

Versuchs-Nr.	Leberbrei g	Titriert: $^1/_5$ n-KOH ccm	Zunahme: $^1/_5$ n-KOH ccm	Bemerkungen
23	14,5 inaktiviert	3,8	—	Gefüttert mit Fleisch und Fett
23	16,9	6,8	2,4	
25	8,5 inaktiert	1,1	—	11 Hungertage
25	13,3	3,9	2,2	

Weiter wurde mit der gleichen Versuchsanordnung das Spaltungsvermögen einer Kaninchenleber gegen zugesetztes Schweinefett[1]) geprüft.

Versuch 26.

Versuchs-Nr.	Art des Versuches	Leberbrei g	Fett g	Petroläther-extrakt titriert: $^1/_5$ n-KOH ccm	Aus 1. und 2. berechnet	Zunahme
1	Acidität d. zugesetzten Fettes	—	1,0	9,8	—	—
2	Leber ohne Fettzusatz autolysiert	21,6	—	3,0	—	—
3	Inaktivierte Probe . .	22,7	0,5880	7,4	8,9	−1,5
4	Autolyseversuch 24 Stunden . . .	23,7	0,5970	9,6	9,2	+0,4
5	do.	34,2	0,5725	10,1	10,4	−0,3

Zugesetztes Fett ist hier also nicht angegriffen worden. Vergleicht man dagegen nach Abzug des Aciditätswertes des zugesetzten Fettes die inaktivierte Probe mit den 3 übrigen, so findet man wie im vorhergehenden Versuch Zunahmen, und zwar um 1,5, 2,1 und 2,7 ccm $^1/_5$ n-KOH (Probe 2, 4 und 5).

Um genaueren Aufschluß zu erhalten, bis zu welchem Grad die Spaltung des Fettes in der Leber geht, wurde die Methode der aseptischen Autolyse[2]) in den folgenden 5 Versuchen angewendet[3]).

[1]) Dieses enthielt infolge der Darstellung freie Fettsäure.
[2]) Vgl. den erstangeführten Versuch dieser Arbeit.
[3]) Die Tiere wurden sämtlich durch Entbluten getötet.

Versuch 27.

24stündige Autolyse. Titration des nicht mit Wasser gereinigten Petrolätherextraktes.

1. Extrakt aus 12,0 g Leber braucht 6,7 ccm $^1/_5$ n-KOH
2. „ „ 11,4 g „ „ 6,0 „ „
3. „ „ 24,3 g „ [1]) „ 10,4 „ „

Versuch 28.

Titration des Petrolätherextraktes.

Versuchs-Nr.	Art des Versuchs	Leber g	Petrolätherextrakt titriert: $^1/_5$ n-KOH ccm	Berechnet aus 1.	Zunahme	Bemerkungen
1	Sofort extrahiert . .	10,7	2,4	—	—	—
2	Inaktiviert	14,9	3,2	3,3	— 0,1	20 Minuten in kochend. Wasser gestellt
3	24stündige Autolyse	12,7	6,9[2])	2,8	+ 4,1[2])	—
4	Totale Verseifung[3])	18,3	7,3	—	—	Verseifung liefert 0,4948 g Extrakt[4])

Aus diesem Versuche ergibt sich, daß eine totale Spaltung des in der Leber vorhanden gewesenen Fettes stattgefunden haben muß. Ich legte mir nun die Frage vor, wie sich die Kaninchenleber in dieser Beziehung verhält, wenn eine fettige Infiltration erzeugt wird. Dank einem von Herrn Dr. Rose ersonnenen Verfahren[5]), das die Herstellung hochprozentiger und keine Embolien veranlassender Fettemulsionen gestattet, war ich in der Lage, Fettinfiltration direkt durch intravenöse Infusion zu erzeugen.

---

[1]) Diese Probe war zu Beginn des Versuches 40 Minuten auf ein Wasserbad von 60° gebracht worden. Die Temperatur war, wie ersichtlich, zur völligen Inaktivierung ungenügend.

[2]) Es ergibt sich hier ein Überschuß von 1,8 ccm gegen den auf Grund von 4 berechneten Wert, da das Ausschütteln mit Wasser unterlassen wurde.

[3]) Kumagawa-Suto, diese Zeitschr. 8, 1908.

[4]) Das Extrakt ist schwerer als der Titration entspricht infolge des Gehaltes an unverseifbaren Substanzen (Cholesterin).

[5]) Herr Dr. Rose, der mir seine Emulsion in liebenswürdiger Weise zur Verfügung stellte, wird über dieses Verfahren und seine Anwendungen nächstens berichten. Ich spreche auch hier meinen Dank aus.

Versuch 30.

Kaninchen von 1640 g erhält am 18. VI. von 9h 15′ bis 12h 15′ durch intravenöse Infusion 12 g Fett. 12h 20′: Halsschnitt. Blut milchighellrosa. — Leber aseptisch entnommen in 3 Stücken. 18stündige Autolyse.

Versuchs-Nr.	Leber g	Ungereinigtes Petrolätherextrakt $^1/_5$ n-KOH ccm	Gereinigtes Petrolätherextrakt $^1/_5$ n-KOH ccm	Berechnet aus 3.	Erreichte Spaltung %
1	22,6	13,1	9,9[1])	16,3	60,7
2	20,0	10,8	7,9	14,4	54,6
3	14,8	10,7	Sofort verseift: 0,6396 g petrolätherlösliche Substanz		

Bei einer so plötzlichen Überschwemmung der Leber mit Fett, wie in diesem Versuch, bei dem das Fett zum großen Teil noch nicht in die Zellen eingedrungen sein dürfte, vermag die Leber also nur 50 bis 60% des vorhandenen Fettes zu spalten.

Schließlich wurde untersucht, wie sich die autolytischen Vorgänge gestalten, wenn das Fett nicht auf einmal in großen Mengen zugeführt, sondern eine mehrtägige Vorbehandlung mit kleinen Gaben vorgenommen wird.

Versuch 29.

Kaninchen von 1840 g.

6. VI.: 1,2 g Fett intravenös.
7. VI.: 3,0 g " "
9. VI.: 1,5 g " "
12. VI.: 3,0 g " "
13. VI.: Durch Verbluten getötet. Leber aseptisch in 4 Portionen entnommen. Nach 18stündiger Autolyse sind Probe 2 und 3 fast total verflüssigt.

	Art des Versuchs	Leber g	Petrolätherextrakt titriert: ccm $^1/_5$ n-KOH[1])	Berechnet aus 4
1	Inaktiviert	11,9	1,2	—
2	18stündige Autolyse .	11,6	4,2	4,0
3	" "	10,9	3,6	3,8
4	Sofortige totale Verseifung (0,4145 g Extrakt)	15,9	5,5	—

[1]) Reinigung nach Zurücknahme der titrierten Laugenmenge und Abdestillieren des Petroläthers in kräftigem Dampfstrom: 2 Std. lang. Dann Trocknen und Wiederaufnehmen in Petroläther.

Versuch 31.

Kaninchen von 1600 g.

14. VI.: 1,5 g Fett intravenös.
17. VI.: 1,8 g „ „
19. VI.: 3,5 g „ „
20. VI.: 1,5 g „ „
21. VI.: 6 g Fett per Ohrvene von 8h 30′ bis 4h 30′. Aus Carotis entblutet. Leber aseptisch in 3 Stücken entnommen.

Die Verarbeitung der Probe 1 geschah etwas anders als sonst, indem das alkoholische Extrakt nach Entfernen des Alkohols nicht auf dem Wasserbad, sondern bei ca. 30° im Luftstrom getrocknet wurde. Nach der Titration des Petrolätherextraktes wurde der Petroläther abdestilliert, mit der Menge Schwefelsäure, die der zu Titration verwendeten Menge KOH entsprach, wurde wieder sauer gemacht, und die flüchtigen Fettsäuren mit Wasserdampf abgetrieben. Trotzdem über 1 Stunde destilliert wurde, gab nach dem Trocknen und Wiederaufnehmen in Petroläther dieser beim Schütteln mit Wasser noch etwas Säure ab.

1. 27,2 g Leber: Petrolätherextrakt verbraucht vor Reinigung: 16 ccm $^1/_5$ KOH.

Durch Destillation gehen ab . .	7,2 ccm $^1/_{10}$ KOH
Durch Ausschütteln „ „ . .	2,3 „ „ „
	9,5 ccm = 4,8 ccm $^1/_5$ KOH
Gefunden	11,2 ccm $^1/_5$ KOH
Berechnet aus 3:	11,0 „ „ „

2. 15,1 g Leber inaktiviert: 1,7 ccm $^1/_5$ KOH.
3. 19,6 g Leber frisch nach Kumagawa verarbeitet: 0,5161 g petrolätherlösliche Substanz: 7,9 ccm $^1/_5$ KOH.

In Probe 1 hat die Autolyse nach 18 Stunden zu fast kompletter Verflüssigung geführt.

Wir sehen also auch in dieser Leberprobe eine komplette Fettsäureabspaltung vollzogen, obwohl unmittelbar vor Versuchsbeginn 6 g Fett intravenös gegeben wurden. Ob diese vollständige Verseifung durch die Vorbehandlung mit intravenösen Fettinjektionen bedingt war oder durch die niedrigere Dosis gegenüber Versuch 30 (12 g), ist nicht zu entscheiden.

8. Fettspaltung in anderen Organen[1]).

Versuch 23.

a) Milz.

Milz von einem eben getöteten Hund wird zerkleinert und mit Quarz zerrieben. Jede Probe mit 30 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung und 1 ccm Toluol versetzt, durchgeschüttelt und für 24 Stunden in den Brutschrank gebracht.

[1]) Die Tiere, von denen die Organe stammten, wurden sämtlich durch Verblutenlassen aus der Carotis getötet.

Petrolätherextrakt titriert von:

6,3 g Milzbrei	. . . . .	1,2 ccm $^1/_5$ n-KOH
5,5 g „	. . . . .	1,1 „ „ „
4,8 g „	inaktiviert	0,6 „ „ „

Versuch 32.

Hundemilz, asptisch entnommen zur Autolyse (Probe 1).

1. 13,6 g Milz: 3,1 ccm $^1/_5$ n-KOH. Berechnet aus 2: 3,2 ccm.

2. 6,3 g Milz nach Kumagawa verseift, 0,1297 g Petrolätherlösliches, 1,5 ccm $^1/_5$ n-KOH titriert.

Auch bei der Milz wird also während der Dauer einer 24stündigen aseptischen Autolyse fast alles vorhandene Neutralfett gespalten (96%). Allerdings ist die absolute Menge desselben in der Milz ziemlich unbedeutend (0,48%, als Tristearin berechnet).

Versuch 34.

b) Lunge.

Kaninchen von ca. 1700 g.

Am 8. VI. von 12^h bis $12^h 45'$: 3 g Fett intravenös. 10' danach durch Entbluten getötet.

Rechte Lunge: 3,2 g zur Autolyse[1]) Petrolätherextrakt verbraucht: 1,9 ccm $^1/_{10}$ KOH.

Linke Lunge: 3,0 g verseift. Petrolätherextrakt verbraucht: 3,3 ccm $^1/_{10}$ KOH, 0,1199 g Petrolätherlösliches.

Die durch die aseptische Autolyse erreichte Fettsäureabspaltung beträgt hier nur 54% der möglichen.

c) Niere.

Rechte Niere 4,8 g zur aseptischen Autolyse. Petrolätherextrakt verbraucht: 1,9 ccm $^1/_{10}$ KOH.

Linke Niere 4,9 g verseift: 4,2 ccm $^1/_{10}$ n-KOH.

Erreichte Spaltung: 46%.

Versuch 35.

Nieren eines fettreichen Hundes. In Narkose entblutet.

Linke Niere zur aseptischen Autolyse. 26,3 g. Petrolätherextrakt verbraucht: 8,7 ccm $^1/_{10}$ KOH.

Rechte Niere 27,0 g verseift: 1,2028 g Petrolätherlösliches. Titriert: 40,9 ccm $^1/_{10}$ KOH.

Erreichte Spaltung 22%.

---

[1]) Zum aseptisch entnommenen Organ wurde auch hier kein Desinficiens gesetzt, obwohl, wie bekannt, das Lungeninnere stets Keime enthält. Es war aber nach 18stündiger Autolyse durch den Geruch keine Fäulnis zu konstatieren.

Versuch 36. Kaninchen[1]).

d) Muskeln.

1. 12,2 g inaktiviert zur Autolyse.

Petrolätherextrakt verbraucht:	1,8 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
Wasserlöslich[2])	0,7 „ „ „
Gefunden . . .	1,1 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
Berechnet aus 4:	2,1 „ „ „

Spaltung 52%.

2. 15,5 g 24 Stunden aseptisch autolysiert.

Petrolätherextrakt titriert . .	2,2 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
Wasserlöslich	0,6 „ „ „
Gefunden . . .	1,6 ccm $^1/_{10}$ n-KOH

Berechnet: 2,7 ccm. Spaltung: 59%.

3. 16,3 g 24 Stunden aseptisch autolysiert.

Petrolätherextrakt titriert . .	2,3 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
Wasserlöslich	0,6 „ „ „
Gefunden . . .	1,7 ccm $^1/_{10}$ n-KOH

Berechnet: 2,8 ccm. Spaltung: 60%.

4. 16,1 g verseift: 0,0946 g Petrolätherlösliches. Titriert: 2,8 ccm $^1/_{10}$ n-KOH.

Die zur Autolyse verwendeten Stücke waren aus der Längsmuskulatur des Rückens entnommen. Wenn das Tier an den Beinen aufgehängt und kopfwärts enthäutet wird, ist an dieser Stelle ein aseptisches Arbeiten leicht erreichbar. Die zur Verseifung verwendeten Stücke stammten aus der Adduktorenmuskulatur des Hinterbeines. Es wurde peinlich darauf geachtet, daß kein Fettgewebe mitgenommen wurde. Die angegebenen Werte beziehen sich auf frisches, unzerkleinertes Gewebe.

Versuch 38.

Junges Kaninchen von 1000 g durch Halsschnitt getötet, Muskelstücke aseptisch entnommen.

1. 16,7 g frisch untersucht.

Petrolätherextrakt titriert[3]) . . 1,2 ccm $^1/_{10}$ KOH

Berechnet aus 4: 3,6 ccm. Spaltung: 34%.

[1]) Das Tier hatte, bevor es getötet wurde, 3 Stunden in Narkose gelegen.

[2]) Die Abtrennung der wasserlöslichen Säure (Milchsäure) geschah hier so, daß die bei der Titration verwendete Laugenmenge genau zurückgenommen wurde. Es wurde dann von der zur Titration verwendeten Lösung abgedampft, der Rückstand mit Wasser behandelt, durch Asbest filtriert und titriert. Da keine völlig klaren Filtrate erhalten wurden, sind die durch Abzug des wasserlöslichen Teiles gefundenen Zahlenwerte etwas zu klein.

[3]) Befreiung von wasserlöslicher Säure geschah wie gewöhnlich durch wiederholtes Ausschütteln mit Wasser.

2. 15,0 g inaktiviert.
   Petrolätherextrakt titriert . . 1,0 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
   Berechnet aus 4: 3,2 ccm. Spaltung: 31 %.
3. 14,6 g: 18 Stunden aseptisch autolysiert.
   Petrolätherextrakt titriert . . . 1,3 ccm $^1/_{10}$ KOH
   Berechnet aus 4: 3,1 ccm. Spaltung: 42 %.
4. 20,6 g verseift: 0,2058 g petrolätherlösliche Substanz; titriert: 4,4 ccm $^1/_{10}$ n-KOH.

Versuch 37.

e) Lymphdrüse.

Die große Lymphdrüse von der Radix mesenterii des Hundes (7,5 g) wird unter aseptischen Maßregeln entnommen, 18 Stunden autolysiert und erschöpfend mit Alkohol extrahiert. Das Volumen des Extraktes wird bestimmt und halbiert.

a) Freie Fettsäure. Gereinigter Petrolätherextrakt: 2,1 ccm $^1/_{10}$ n-KOH (37 %).

b) Gesamtfettsäuren: Die Verseifung gibt 0,1608 Petrolätherlösliches und 5,7 ccm $^1/_{10}$ n-KOH.

4. Fettspaltung im Blut.

Es wurde schon oben erwähnt, daß Zusatz von Serum die Spaltung im Fettgewebe (mit einer Ausnahme) nicht förderte. Auch Blut als solches war wirkungslos. Eine neue Möglichkeit, die Frage nach der Fettspaltung im Blut experimentell zu verfolgen, bot sich durch die bereits erwähnte Rosesche Methode. Es wurde zunächst verglichen, wie sich in einem durch intravenöse Fettinfusion fettangereicherten Blut die Spaltung im Vergleich zu hitzeinaktivierten Proben gestaltet.

Versuch 34.

Kaninchen von ca. 1700 g. Infusion 3 g Fett. In sterilen, mit Marken versehenen Röhrchen werden je 15 ccm Blut unter aseptischen Kautelen aufgefangen. Das Blut ist hellrot, das Fett rahmt allmählich auf. Alle Proben 24 Stunden bei 38°. Petrolätherextrakt titriert:

a) (inaktivierte Probe): 0,7 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
b) " " 1,2 " " "
c) " " 1,1 " " "

Weiterhin wurde versucht, ob sich die hier beobachtete schwache spaltende Wirkung durch mehrmalige Fettinfusionen steigern ließe[1]).

[1]) Vgl. Abderhalden und Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 75, 30, 1911. — Abderhalden und Lampé, 78, 396, 1912. — Rona und Michaelis, diese Zeitschr. 31, 345, 1911. — Bergel, Arch. f. klin. Med. 106, Heft 1, 1912.

Versuch 29 (siehe oben).

4 malige Vorbehandlung mit Fettinfusionen. 6. bis 12. VI. Am 13. VI.: Blutegelextrakt intravenös, Tier durch Verbluten getötet. Je 14 ccm Blut aufgefangen, dazu je 0,3 g Fett (in Form der Emulsion) und 1 ccm Toluol. 20 Std. bei 38°.

Petrolätherextrakt titriert.

a) 0,7 ccm $^1/_{10}$ KOH inaktivierte Probe.
b) 1,3 „ „ „

Versuch 31 (siehe oben).

4 mal vorbehandelt. Kaninchen von 1600 g. 21. VI. 6 g Fett intravenös. Entblutet aus Carotis. 3 Proben à 15 ccm aufgefangen. 24 Stunden bei 38°. — Petrolätherextrakt titriert:

a) inaktiviere Probe: 0,7 ccm $^1/_{10}$ n-KOH
b) 2,0 „ „ „
c) 1,7 „ „ „

Es hat also eine mit der angewendeten Methode nachweisbare Beeinflussung des lipatischen Vermögens des Blutes durch die intravenösen Fettinfusionen nicht stattgefunden. Es scheint demnach der Blutlipase beim Fetttransport eine wesentliche Bedeutung nicht zuzukommen. Bei den Mechanismen, durch die der Körper einen Überschuß an zugeführtem Fett verarbeitet, ist eine gesteigerte fermentative Spaltung in der Blutbahn nicht beteiligt.

Zusammenfassung.

In der folgenden, die mitgeteilten Versuche resumierenden Tabelle sind die Fettsäuremengen in ccm Normalsäure ausgedrückt. In der die Leber betreffenden Tabelle entsprechen 2 Werte, die mit * versehen sind, rechnerisch nicht unmittelbar den in den Protokollen mitgeteilten. Es handelt sich um den Aciditätswert zweier, wie schon oben mitgeteilt, weiter nicht gereinigter Petrolätherextrakte. Diese beiden Werte wurden auf Grund des Versuches Nr. 31, bei dem die Gesamtmenge der flüchtigen, in Petroläther übergegangenen Fettsäuren neben den hochmolekularen festgestellt wurde, in folgender Weise berechnet: 27,2 g Leber enthielten flüchtige, in den Petroläther übergegangene Fettsäuren entsprechend 4,8 ccm $^1/_5$ n-KOH nach der Autolyse. 100 g Leber entsprechend 17,65 $^1/_5$ n- oder 3,53 ccm n-KOH. Da die Werte überall auf 100 g Leber gerechnet sind, wurde die Zahl 3,53 an den beiden bezeichneten Stellen von den aus den Protokollen sich ergebenden Zahlen abgezogen.

Wo mehrere Proben untersucht sind, kam in die Tabelle der Durchschnittswert. Die Säurezahlen der frischen bzw. inaktivierten Leber in

Vers. 27 und 28 sind zweifellos zu hoch, weil das Waschen des Petrolätherextraktes mit Wasser unterlassen worden war, doch fehlt es an einem Vergleichswert behufs Umrechnung.

100 g Leber enthalten hochmolekulare Fettsäure.

Versuch Nr.	In frischem bzw. inakt. Zustande als freie Säure	Nach asept. Autolyse als freie Säure	Insgesamt	Nach der Autolyse sind in Freiheit %
27	5,03[1])	7,32*	—	—
28	4,39	7,33*	7,98	91,9
30	—	8,33	14,46[2])	57,6
29	2,02	6,92	6,92	100
31	2,25	8,23	8,06	102

Es ist bei dieser Tabelle zu berücksichtigen, daß von Mengen von 10 bis 20 g auf 100 g und ccm $^1/_5$ n auf ccm n-Säure gerechnet ist, womit jeder Fehler eine Multiplikation mit 25 bis 50 erfährt. Angesichts dessen ist die Übereinstimmung befriedigend.

Es geht aus der Tabelle hervor (Vers. 28, 29 und 31), daß die Leber sämtliche in ihr in Form von Fett (und anscheinend auch von Lipoid) vorhandenen Fettsäuren bei der aseptischen Autolyse in Freiheit zu setzen vermag. Nur wenn man unmittelbar vor dem Beginn der Autolyse durch Fettinfusion ihren Fettsäuregehalt auf das Doppelte gegen den Durchschnitt bringt (Vers. 30), bleibt die Spaltung dagegen zurück, überschreitet aber immerhin 50%. In Versuch 29, 30 und 31 beträgt die von 100 g frischer Leber gespaltene Fettmenge (als Tristearin berechnet) etwa 2 g. Die Raschheit, mit der in der lebenden Leber die Fettinfiltration verschwindet — über solche Versuche wird noch Herr Dr. Rose berichten — zeigt, daß die Fettspaltung unter physiologischen Verhältnissen ebenso rasch verläuft.

Nur noch bei der Milz finden wir eine ähnliche erhebliche Fettsäureabspaltung. Hier ist aber einerseits der prozentuale Fettsäuregehalt wesentlich niedriger als in der Leber, andererseits läßt die viel geringere Gesamtmasse die physiologische Bedeutung dieses Prozesses gegenüber der Leber weit zurücktreten. In der ziemlich fettreichen Hundeniere ist die Fett-

[1]) Unvollständige Inaktivierung (siehe oben).

[2]) Unmittelbar vor dem Versuch wurden 12 g Fett intravenös beigebracht, daher der hohe Gesamtwert.

spaltung sehr gering. Bei der Kaninchenniere und -lunge, wo der Spaltungsvorgang etwas ausgiebiger erscheint, verliert er durch die relative Kleinheit der Organe an Bedeutung. Die Hundelymphdrüsen im Mesenterium sind an Masse gering und zeigen geringe Wirkung.

Die Skelettmuskeln nehmen zwar bekanntlich durch ihre Masse einen ganz hervorragenden Anteil an den Stoffwechselvorgängen, am Fettstoffwechsel scheinen sie aber wenig beteiligt. Beim Kaninchen haben sie einen relativ niedrigen Fettsäuregehalt und vermögen im Autolyseversuch nur wenig Fettsäure in Freiheit zu setzen.

Danach ist die Stellung der Leber im intermediären Fettstoffwechsel ganz eigenartig und wichtig.

Protokoll-Nr.	Organ (100 g) und Tierart	Gesamtfettsäure ccm n-Säure	Nach Autolyse befinden sich in Freiheit ccm n-Säure	Gehalt an freier Fettsäure %
32	Milz vom Hund . . .	4,76	4,56	95,8
34	Lunge v. Kaninchen[1]	11,00	5,94	54,0
34	Niere v. Kaninchen[1]	8,57	3,96	46,2
35	Niere v. Hund . . .	15,15	3,31	21,8
37	Lymphdrüse v. Hund	15,20	5,6	36,8

100 g Kaninchenmuskeln enthalten hochmolekulare Fettsäuren:

Protokoll-Nr.	Fettsäuren im frischen Zustand ccm	Gesamtfettsäure ccm n-Säure	Nach Autolyse befinden sich in Freiheit ccm n-Säure	Gehalt an freier Säure	
				nach Autolyse %	Zuwachs %
36	0,9	1,74	1,04	60,0	8,2
38	0,7	2,14	0,90	42,1	9,4

Die Tatsache, daß die Leber bei weitem die stärkste lipatische Wirkung entfaltet, steht mit dem Befund von Loevenhart im Einklang, der die Leber gegen Äthylbutyrat weit wirksamer fand als alle anderen Organe, selbst als Pankreas. Es bleibt jedoch offen, ob es sich bei Loevenharts Butyrinase um ein auf echte Fette wirkendes Ferment gehandelt hat. Daß in seinem Falle die Lipolyse des Äthylbutyrats stets unvollständig blieb, scheint dagegen zu sprechen, da meine Leberlipase — wie oben zu sehen — leicht zu kompletter Spaltung

[1]) Vor Beginn des Versuchs 3 g Fett intravenös.

führte. Der Versuch einer Deutung der bei den verschiedenen Organen erhobenen Befunde darf wohl in der Richtung gemacht werden, daß dem Zuwachs an freier Fettsäure, der nach Hitzewirkung ausbleibt, ein fermentativer Prozeß zugrunde liegt. Die Bedeutung desselben kann kaum anders denn als Einleitung zum physiologischen Verbrauch der freigewordenen Fettsäure aufgefaßt werden. Wo der endgültige Verbrauch erfolgt, ist danach nicht zu entscheiden. Wenn man jedoch bedenkt, daß das gefundene Spaltungsvermögen der Leber groß genug ist, um das gesamte in 24 Stunden aufgenommene Nahrungsfett innerhalb dieser Zeit zu verseifen, und daß es wenig wahrscheinlich ist, daß die Leber diese erhebliche Menge Nährmaterial ausschließlich für ihre eigenen Funktionen verwendet, so muß man als nächstliegend annehmen, daß die Lipasewirkung der Leber vorwiegend die Bedeutung hat, dem Stoffwechsel der übrigen Organe zu dienen.

Die Leber würde dann dem in den Kreislauf getretenen Fett gegenüber die gleiche Rolle spielen wie dem Zucker gegenüber: Aufnahme des zirkulierenden Überschusses in Form von Reservefett, dann aber dem Bedarf entsprechend Verseifung und Abgabe der Fettsäure an Blut und Gewebe.

Für eine solche Bedeutung spricht auch die Beobachtung, daß die Fettinfiltration der Leber in kurzer Zeit wieder abheilt[1]). Demnach wäre die Leber also bei der Regulation des Fettgehaltes des Blutes beteiligt.

Eine andere Überlegung führt zu ähnlichen Vorstellungen. Der Fettgehalt der Leber ist relativ rascher Schwankungen fähig, während wir den Füllungszustand der eigentlichen Fettlager in weit langsamerem Zu- oder Abnehmen begriffen finden[2]). Also dürfen wir wohl annehmen, daß die Leber ein zwischengeschaltetes Depot zwischen den Hauptstapelplätzen des Fettes und seinen Verbrauchsstellen darstellt. Mit anderen Worten: durch die Leber würde ein Überschuß von Fett im Blut hintangehalten und ein Defizit vorläufig gedeckt werden.

---

[1]) Rosenfeld, Zeitschr. f. klin. Med. 28, 1895.

[2]) Die schwache Fettsäureabspaltung, die wir beim eigentlichen Fettgewebe fanden, dürfte vielleicht nicht allein durch die ungünstigen Bedingungen des Versuches verursacht sein.

Man darf daher annehmen, daß es Einrichtungen gibt, die einen Einfluß auf den Fettgehalt des Blutes durch die Leber ausüben. Da eine Erforschung solcher Beziehungen eine genauere Kenntnis der Faktoren, die überhaupt den Blutfettgehalt beeinflussen, voraussetzt, so mag es gestattet sein, anhangsweise über einige Versuche in dieser Beziehung zu berichten.

Der Fettgehalt des Blutes unter verschiedenen Bedingungen.

Am eingehendsten studiert sind die Veränderungen, die der Blutfettgehalt im Hunger erfährt. Seit F. N. Schulz[1]) die Angabe gemacht hatte, daß im Hunger das Blutfett stark vermehrt sei, fand diese Beobachtung zahlreiche Nachprüfungen mit sehr verschiedenen chemischen Methoden und Resultaten. Als Letzter hat Lattes[2]) mit der Kumagawa-Sutoschen Methode die Frage geprüft und keine wesentlichen Zunahmen der petrolätherlöslichen Bestandteile des Blutes im Hunger konstatieren können. Auf Grund einiger Versuche kann ich diese Angabe bestätigen. Was ihre Deutung anlangt, so ist zunächst darauf hinzuweisen, daß der Organismus im Hunger von seinem eigenen Fett lebt. Diese Zehrung müßte sich natürlich auch am Blutfett durch Abnahme manifestieren. Ein Konstantbleiben des Blutfettgehaltes im Hunger beweist also, daß ein Ersatz durch gesteigerte Mobilisierung von Fett stattgefunden hat.

In den hier mitgeteilten Versuchen wurde der „Fettgehalt" des Plasmas bestimmt. Es wurde die Kumagawa-Sutosche Verseifungsmethode angewendet[3]). Die Werte wurden vom Oxalatplasma auf reines Plasma umgerechnet unter der Annahme, daß 40% Blutkörperchen vorhanden seien, und die zugesetzte Oxalatlösung sich ganz im Plasma befinde. Die untersuchten Mengen Plasma wurden stets in geschlossenen Gläschen gewogen. Die Blutentnahme wurde bei den Hunden in Narkose aus der Femoralis oder einem Seitenast dieser gemacht, bei Kaninchen ohne Narkose aus der Carotis. — Alle angegebenen Werte stellen die Mittel aus 2 Analysen dar.

---

[1]) Fr. N. Schulz, Arch. f. d. ges. Physiol. 65, 299, 1896.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 66, 132, 1911. (Dort Literatur.)

[3]) Bezüglich der Verwendung derselben für Blut und dessen Derivate vgl. Shinidzu, diese Zeitschr. 28, 37, 1910, der Kombination mit Alkoholextraktion empfiehlt. Die einfache Verseifung dürfte aber auch zuverlässige Vergleichsresultate für Plasma darbieten.

Hunde.

Hundeart	Normalwert Petrolätherextrakt %	Hungerwert	Hungertage
Fetter Spitz . . .	0,877	1,008	4
Magerer Foxterrier	0,537	0,551	11

Kaninchen.

Gewicht g	Normalwert Petrolätherextrakt %	Hungerwert	Hungertage	Abnahme des Körpergewichts %
2100	0,356	0,328	5	16
2240	0,331	0,292	5	15
3100	0,272	0,380	7	30

Weiter wurde untersucht, wie sich der Gehalt des Plasmas an petrolätherlöslichen Stoffen verhält, wenn Blutentziehungen gemacht werden, bzw. wie weit nach 24 Stunden der Ersatz sich vollzogen hat.

Es wurde im allgemeinen Tieren von 2000 g 30 g Blut entnommen, schwereren mehr, leichteren weniger. In den meisten Fällen wurde das entzogene Blut durch intravenöse Injektion von Ringerlösung ersetzt. In einer Reihe von Fällen wurde gleichzeitig der Blutzuckergehalt bestimmt[1]). Die Enteiweißung geschah mit kolloidalem Eisenhydroxyd[2]), die Zuckerbestimmung durch Titration nach Benedikt[3]) in einer der kleinen zur Verfügung stehenden Plasmamenge entsprechenden Weise[4]).

Gewicht g	Blutentnahme g	1. Blutentnahme Fettgehalt %	Zuckergehalt %	Nach 24 Stunden Fettgehalt %	Zuckergehalt %	Ersatz
1600	36,8	0,384	0,185	0,338	0,191	35 g Ringerlösg.
1700	26,3	0,247	—	0,299	0,126	—
2100	29,7	0,376	0,126	0,264	0,116	40 g Ringerlösg.

[1]) Es wurden Zusammenhänge zwischen Fett- und Zuckergehalt des Blutes vermutet. Vgl. die Untersuchungen von Seo (Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 61, 1909) über Blutfettgehalt bei pankreasdiabetischen Hunden.

[2]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. 7, 329, 1908; 8, 356, 1908.

[3]) Benedikt, Journ. of Biolog. Chem. 9, 57, 1910.

[4]) Wo bei der erstentnommenen Blutprobe Zuckerbestimmungen ausgeführt wurden, mußte aus Mangel an Material auf die Kontrollanalyse der Fettbestimmung verzichtet werden.

Wie ersichtlich, wird der Gehalt des Blutes an petrolätherlöslichen Stoffen mit ziemlicher Konstanz aufrechterhalten. 24 Stunden nach einer reichlichen Blutentnahme wird ungefähr der gleiche Wert wie zuerst wiedergefunden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der wirkliche Wert bei der zweiten Untersuchung noch etwas höher liegen muß als angegeben, da die Blutkörperchen, wie schon das Zentrifugat zeigt, noch nicht ersetzt sind und der relativen Vermehrung des Plasmas höchstwahrscheinlich keine gleichmäßige Zunahme aller Bestandteile, sondern in erster Linie eine solche von Wasser und Salzen zugrunde liegen wird. Besondere Untersuchungen hierüber wurden nicht angestellt.

Weiter wurde geprüft, wie sich die Verhältnisse gestalten, wenn der Ringerlösung Zucker beigegeben wird [intravenöse Zufuhr[1])].

Gewicht g	Blutentnahme g	1. Blutentnahme		Nach 24 Stunden		Ersatz
		Fettgehalt %	Zuckergehalt %	Fettgehalt %	Zuckergehalt %	
2050	43,1	0,276	0,131	0,427	0,187	4 g Dextrose, 40 g Ringerlösg.
2100	34,3	0,337	0,192	0,347	0,145	5 g Dextrose, 50 g Ringerlösg.
2000	33,3	0,206	—	0,153	—	8 g Dextrose, 40 g Ringerlösg.
2100	27,9	0,317	—	0,257	0,233	10 g Dextrose per os!
2270	29,1	0,275	—	0,211	0,543[2])	30 g Dextrose per os, subcutan, per Vene

Wie aus dieser Versuchsreihe ersichtlich, sind nach Zuckerzufuhr die Verhältnisse keine anderen als nach einfacher Blutentnahme. In 1 Fall nur sehen wir, daß sich eine beträchtlichere Zunahme des Fettgehaltes einstellt, als es der Breite der Fehlergrenzen entspricht. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Gehalt des Blutes an Fett und an Zucker scheint demnach nicht zu bestehen. Auch aus einem Versuch, in dem

[1]) Die Infusionen wurden ganz langsam gemacht und dauerten ³/₄ bis 1¹/₂ Stunden.

[2]) Der Zucker wurde in diesem Versuch nicht wie in den anderen gleich nach der ersten Blutentnahme gegeben, sondern erst am nächsten Tag im Verlauf von 8 Stunden, und das Tier dann getötet.

das Blut an Fett angereichert wurde, ergab sich nichts Derartiges:

Kaninchen von 1700 g.

24. V.: 23,2 g Blut entnommen. Das Plasma ergibt 0,415 % Petrolätherextrakt.

Sogleich nach der Blutentnahme intravenöse Infusion von 5 g Fett (Rosesche Emulsion).

25. V.: Durch Verbluten getötet. Das Plasma enthält: 1,058 % Fett, 0,119 % Zucker.

Schlußsätze.

1. Es wird durch Versuche mit aseptischer Autolyse der Kaninchenleber der Nachweis geführt, daß die Leber in hervorragender Weise Neutralfette zu spalten vermag. Die Spaltung ist bei einem Fettgehalt von 2 % quantitativ. Dies Vermögen geht durch Hitzewirkung verloren.

2. Der gleiche Vorgang läßt sich auch in anderen Organen nachweisen, hat aber hier quantitativ eine untergeordnete Bedeutung, so daß der Leber im Fettstoffwechsel eine Sonderstellung zukommt. Am stärksten ist die Lipasewirkung in der Milz, dann folgen Muskeln, Lungen, Nieren, Lymphdrüsen. Auch Fettgewebe und Blut weisen Lipasewirkung auf, doch nur in geringem Maße.

3. Der Gehalt des Blutes an Fett (petrolätherlöslichen Stoffen) zeigt im Hungerzustand keine wesentliche Änderung.

4. Nach Blutentziehungen stellt sich im Blut sehr rasch fast der ganze Fettgehalt wieder her.

Es bestehen somit im Organismus Einrichtungen, die den Fettgehalt des Blutes annähernd konstant erhalten.

Über die katalytische Einwirkung des Bleies auf Harnsäurebildung und Harnsäurezersetzung.

Von

Luigi Preti.

(Aus der Clinica delle Malattie professionali dei RR. Instituti Clinici di perfezionamento di Milano.)

(Eingegangen am 8. August 1912.)

Das Vorkommen von Harnsäure ist von zweierlei Fermenten unmittelbar abhängig: einem bildenden und einem zerstörenden.

Ersteres, Xanthinoxydase benannt, oxydiert das Hypoxanthin zu Xanthin und das Xanthin zu Harnsäure; es ist im tierischen Körper stark verbreitet und wurde in der Milz, in den Lungen, in der Leber, im Darm, in den Muskeln und in den Nieren nachgewiesen. Letzteres, als urikolytisch bezeichnet, zersetzt die durch Einwirkung des Ferments Xanthinoxydase sich bildende Harnsäure. Dasselbe ist minder stark verbreitet als ersteres und scheint nur in einigen Organen vorzukommen (Leber, Muskeln, Nieren). In den Organen, wo die beiden Fermente — Xanthinoxydase und urikolytisches — vorhanden sind, spielen sich die Bildungs- und Zersetzungsvorgänge der Harnsäure nebeneinander ab, so daß nach Devoto[1]) die im Harn auftretenden geringen Mengen von Harnsäure gewissermaßen als das Anzeichen eines zwischen der Erzeugung der Harnsäuren und der Zerstörung bzw. Zersetzung derselben bestehenden Parallelismus angesehen werden können.

Es wurde in neuester Zeit nachgewiesen, daß die Harnsäure auch noch auf eine andere Weise zur Entstehung gelangen kann, durch einen synthetischen Prozeß nämlich aus ihren Spaltungsprodukten. Läßt man durch Leberbrei hinzugesetzte Harnsäure zerstören und wird nach erfolgter Zerstörung das Gefäß im Thermostaten verschlossen aufbewahrt, oder dessen Inhalt mit Kohlensäure gesättigt, so sieht man die zerstörte Harnsäure wieder auftreten [Asooli und Izar[2])]. Diese Erscheinung ist

---

[1]) Devoto, Stato attuale delle conoscenze sull' uricemia. Milano 1911. La Gutenberg.

[2]) Ascoli und Izar, Quantitative Rückbildung zugesetzter Harnsäure in Leberextrakten nach vorausgegangener Zerstörung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 58.

von fermentativer Natur [Preti[1])] und dürfte durch das Blut bedingt sein. Inwieweit diese reformative Wirkung einen Einfluß auf das Vorkommen von Harnsäure im Organismus ausübt, läßt sich vorläufig nicht angeben.

Daraus erhellt nun, wie beachtenswert sowohl in klinischer als auch pathologischer Hinsicht jede Erscheinung ist, welche dazu beiträgt, die das Ferment fördernden bzw. hemmenden Bedingungen festzustellen. Dies habe ich nun eben durch die im folgenden mitgeteilten Versuche zu erzielen getrachtet.

Ich habe mir vorgenommen, das Verhalten der beiden obenerwähnten Fermente in Gegenwart von Blei kennen zu lernen, in der Hoffnung, daß es mir hierbei auch gelingen wird, für die bei Bleivergifteten sich einstellenden urikämischen Erscheinungen sowie für die — von mir[2]) bereits festgestellte und von Hirokawa[3]) durch spätere Versuche bestätigte — stärkere Ausscheidung von Harnsäure infolge endovenöser Injektion von Bleihydrosol bzw. Bleisalzen eine Erklärung zu finden.

Meine Versuche zielen nun also dahin, den vom Blei in Salzform ausgeübten Einfluß auf:

1. das Ferment Xanthinoxydase,
2. das urikolytische Ferment

festzustellen.

Einwirkung des Bleies auf das Ferment Xanthinoxydase.

Zu dieser ersten Versuchsreihe habe ich Lebern vom Kalb und Hund und Milz vom Kalb verwendet.

Die Organe wurden zu einem feinen Brei zerhackt und dieser mit einer gewissen Menge physiol. Kochsalzlösung versetzt. Das etwa zwei Stunden lang geschüttelte Gemisch wurde durch Leinwand koliert, die Kolatur in eine Anzahl Kolben verteilt und zum Inhalte jedes einzelnen steigende Mengen von Bleiacetat oder Bleinitrat hinzugesetzt.

Nachdem die Proben zwei Tage lang im Thermostaten bei 37° geblieben — während welcher Zeit man sie öfters geschüttelt hatte —, wurden dieselben, behufs Gerinnung der Eiweißstoffe mit verdünnter Essigsäure schwach angesäuert, zum

---

[1]) Preti, Beiträge zur Kenntnis der Harnsäurebildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 62.

[2]) Diese Zeitschr. 21.

[3]) Diese Zeitschr. 26.

Sieden gebracht. Nach dem Erkalten wurde jede einzelne Probe filtriert, das Koagulum durch fünf Volumina einer mit einer 10%igen NaOH-Lösung schwach alkalisierten physiol. Kochsalzlösung wieder aufgelöst, hierauf abermaliges Kochen unter schwachem Ansäuern mit verdünnter Essigsäure, Filtrieren nach dem Erkalten. Das Verfahren wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurden die einzelnen Filtrate gesammelt und, nachdem dieselben im Wasserbad verdampft worden waren, die Harnsäure nach Salkowskis Verfahren bestimmt, worauf deren Menge durch Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl (H_2SO_4 konzentr. $CuSO_4$ — K_2SO_4) bestimmt wurde.

Versuch 1.

2000 g Kalbsleberbrei + 8000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 56 ccm Chloroform; durch 2 Stunden geschüttelt, hierauf durch Leinwand koliert und in 8 Teile verteilt.

1. 1000 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 46,3 mg
2. 1000 ccm, nach dreitägigem Verweilen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . . „ 104,2 „
3. 1000 ccm + 5 ccm einer 0,01%igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 108,3 „
4. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,01%igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 111,1 „
5. 1000 ccm + 5 ccm einer 0,1%igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 170,7 „
6. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,1%igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 104,4 „
7. 1000 ccm + 5 ccm einer 1%igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 92,7 „
8. 1000 ccm + 10 ccm einer 1%igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 80,9 „

Versuch 2.

2000 g Kalbsleberbrei + 8000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 56 ccm Chloroform; durch 2 Stunden geschüttelt, hierauf durch Leinwand koliert und in 8 Teile verteilt.

1. 1000 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 5,8 mg
2. 1000 ccm, nach dreitägigem Verweilen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . . „ 74,7 „
3. 1000 ccm + 5 ccm einer 0,01%igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 99,3 „
4. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,01%igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 183,0 „

5. 1000 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . ū. 106,1 mg
6. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 98,5 „
7. 1000 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 101,2 „
8. 1000 ccm + 10 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 83,4 „

Versuch 3.

435 g Kalbsmilzbrei + 6000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 35 ccm Chloroform; durch 2 Stunden geschüttelt, hierauf durch Leinwand koliert und in 7 Teile verteilt.

1. 800 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ū. 12,3 mg
2. 800 ccm, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . . „ 25,0 „
3. 800 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 34,4 „
4. 800 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 74,0 „
5. 800 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 28,7 „
6. 800 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 33,2 „
7. 800 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 19,2 „

Versuch 4.

500 g Kalbsmilzbrei + 6000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 35 ccm Chloroform; durch 2 Stunden geschüttelt, hierauf durch Leinwand koliert und in 7 Teile verteilt.

1. 800 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ū. 00,0 mg
2. 800 ccm, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . . „ 14,5 „
3. 800 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 28,3 „
4. 800 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 37,2 „
5. 800 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 26,3 „
6. 800 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 27,2 „
7. 800 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 20,5 „

Versuch 5.

200 g Hundeleberbrei + 2000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 15 ccm Chloroform; durch 2 Stunden geschüttelt, hierauf durch Leinwand koliert und in 7 Teile verteilt.

1. 270 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 8,4 mg
2. 270 ccm, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . . „ 16,2 „
3. 270 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 18,0 „
4. 270 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 60,4 „
5. 270 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 88,3 „
6. 270 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 30,2 „
7. 270 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 19,7 „

Versuch 6.

350 g Hundeleberbrei + 2000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 15 ccm Chloroform; durch 2 Stunden geschüttelt, hierauf durch Leinwand koliert und in 7 Teile verteilt.

1. 270 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 17,5 mg
2. 270 ccm, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . . „ 28,8 „
3. 270 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 71,2 „
4. 270 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 94,3 „
5. 270 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 80,5 „
6. 270 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten „ 50,5 „
7. 270 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten koaguliert, enthalten . . . „ 40,2 „

Aus diesen Versuchen sowie aus noch anderen, deren Mitteilung ich hier der Kürze halber unterlassen will, ergibt sich nun folgendes: **Durch kleine Bleimengen in Form von neutralem Bleiacetat und von Bleinitrat wird bei postmortaler Autolyse der Kalbsleber (Versuch 1 bis 2), der Kalbsmilz (Versuch 3 bis 4), der Hundeleber (Versuch 5 bis 6) die Bildung von Harnsäure gefördert durch große Mengen hingegen gehemmt.**

Einwirkung des Bleies auf das urikolytische Ferment.

Als Untersuchungsmaterial habe ich Leber und Niere vom Kalb und Leber vom Hund gewählt.

Nach erfolgter Zerkleinerung wurden die Organe mit physiologischer Kochsalzlösung und überschüssigem Chloroform verdünnt, das Gemisch durch 1 Stunde geschüttelt und hierauf durch Leinwand koliert. Zur Kolatur wurde eine gewisse Menge Harnsäure in so viel Kubikzentimeter von $^n/_{10}$ aufgelöst, als eben zu ihrer Umwandlung in harnsaures Salz hinreichten. Nach sorgfältigem Durchschütteln wurde das Gemisch in eine Anzahl Proben verteilt und jede einzelne derselben mit steigenden Mengen von Bleiacetat- oder Bleinitratlösung versetzt; bei einer — zur Kontrolle bestimmten — war die physiologische Kochsalzlösung durch destilliertes Wasser ersetzt worden; sämtliche Proben wurden dann — nachdem man sie mittels physiologischer Kochsalzlösung auf das gleiche Volumen gebracht hatte — im Thermostaten bei 38° 2 Tage hindurch stehen gelassen, wo sie durch Aspiration mit Wasserpumpen einen vorher durch eine Reihe von Gefäßen mit darin enthaltener konzentrierter Ätznatronlösung geleiteten Luftstrom fortwährend zugeführt erhielten. Nach ihrem Verweilen im Thermostaten wurden die Proben nach dem bereits beschriebenen Verfahren behandelt.

Ich lasse hier nun die Protokolle der einzelnen Versuche nachfolgen: der Kürze halber muß ich mich aber hierbei — unter den vielen ausgeführten — darauf beschränken, nur die den Typus darstellenden mitzuteilen.

Versuch 7.

1000 g Kalbsleberbrei + 8000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 56 ccm Chloroform; das Ganze 2 Stunden lang geschüttelt und durch Leinwand koliert. Zur Kolatur werden etwa 2 g Harnsäure zugesetzt; das Gemisch wird hierauf in 8 Teile verteilt.

1. 1000 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ū. 189,3 mg
2. 1000 ccm, nach 3 tägigem Verweilen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . „ 75,3 „
3. 1000 ccm + 5 ccm einer 0,01 °/₀igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . „ 80,4 „

4. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . ü. 78,3 mg
5. 1000 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . „ 73,6 „
6. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . „ 81,3 „
7. 1000 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . „ 71,5 „
8. 1000 ccm + 10 ccm einer 1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen im Thermostaten bei Luftdurchleitung koaguliert, enthalten . . . . „ 74,6 „

Versuch 8.

1000 g Kalbsleberbrei + 6000 ccm physiol. Kochsalzlösung + 35 ccm Chloroform; das Ganze 2 Stunden lang geschüttelt und durch Leinwand koliert. Zur Kolatur werden etwa 3 g Harnsäure zugesetzt; das Gemisch wird hierauf in 6 Teile verteilt.

1. 1000 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 371,2 mg
2. 1000 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 126,4 „
3. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 130,8 „
4. 1000 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 131,7 „
5. 1000 ccm + 10 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 127,6 „
6. 1000 ccm + 20 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 120,1 „

Versuch 9.

250 g Kalbsnierenbrei + 2100 ccm physiol. Kochsalzlösung + 15 ccm Chloroform; das Ganze 2 Stunden lang geschüttelt und durch Leinwand koliert. Zur Kolatur werden etwa 2 g Harnsäure zugesetzt; das Gemisch wird hierauf in 7 Teile verteilt.

1. 300 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 218 mg
2. 300 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 60 „
3. 300 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 58 „
4. 300 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 64 „
5. 300 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 57 „
6. 300 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 63 „
7. 300 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 59 „

Versuch 10.

250 g Kalbsnierenbrei + 2100 ccm physiol. Kochsalzlösung + 15 ccm Chloroform; das Ganze 2 Stunden lang geschüttelt und durch Leinwand koliert. Zur Kolatur werden etwa 2 g Harnsäure zugesetzt; das Gemisch wird hierauf in 7 Teile verteilt.

1. 300 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 280 mg
2. 300 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 75 „
3. 300 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 80 „
4. 300 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 77 „
5. 300 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 81 „
6. 300 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 72 „
7. 300 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 76 „

Versuch 11.

Zu diesem Versuche habe ich ausgewaschene Hundeleber benutzt. Nachdem das Tier durch Verbluten getötet worden, wurde eine physiol. Kochsalzlösung (etwa 10 l) durch die Leber geleitet, die bei der Pfortader ein- und bei der Brusthohlvene wieder herausströmte. Dadurch wurde die Leber nahezu vollständig vom Blute befreit. Die weitere Behandlung ist genau die nämliche, wie bei den vorhergehenden Versuchen.

350 g Brei von ausgespülter Hundeleber + 2100 ccm physiol. Kochsalzlösung + 15 ccm Chloroform; das Ganze 2 Stunden lang geschüttelt und durch Gaze filtriert. Zur Kolatur wurden ungefähr 2 g Harnsäure verwendet; das Gemisch wurde hierauf in 7 Teile geteilt.

1. 300 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . Ü. 200 mg
2. 300 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 85 „
3. 300 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 90 „
4. 300 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 83 „
5. 300 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 88 „
6. 300 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 84 „
7. 300 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 87 „

Versuch 12.

320 g Brei von ausgespülter Hundeleber + 2100 ccm physiol. Kochsalzlösung + 15 ccm Chloroform; das Ganze 2 Stunden lang geschüttelt uud durch Leinwand koliert. Zur Kolatur wurden ungefähr 2 g Harnsäure zugesetzt; das Gemisch wurde hierauf in 7 Teile geteilt.

1. 300 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . Ü. 190 mg
2. 300 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 70 „
3. 300 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 68 „

4. 300 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten ü. 72 mg
5. 300 ccm + 5 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 74 „
6. 300 ccm + 10 ccm einer 0,1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 67 „
7. 300 ccm + 5 ccm einer 1 %igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 68 „

Versuch 13.

Bei diesem Versuche habe ich die Einwirkung von Bleiacetat auf das isolierte urikolytische Ferment anstatt auf das durch wässerige Extrahierung der Leber gewonnene untersucht. Bekanntlich sind verschiedene Methoden zur Isolierung des urikolytischen Ferments empfohlen worden [Wiener[1]), Wiechowski und Wiener[2]), Croftan[3]), Galeotti[4])].

Das von von mir gewählte Verfahren ist das Galeottische, das ich hier kurz zusammenfasse. Hundeleber (350 g) wurde in einem Mörser mit Quarzpulver fein zerkleinert und der hierdurch erhaltene Brei einem starken Druck ausgesetzt. Der daraus gewonnene, behufs Entfettung filtrierte Saft wurde mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt, der Niederschlag rasch auf ein Filter gebracht und mit 2000 ccm physiol. Kochsalzlösung ausgezogen.

Zu dem das Ferment enthaltenden Filtrat habe ich sodann 2 g Harnsäure, in der üblichen Weise gelöst, zugesetzt, das Gemisch in 8 Teile verteilt und nach dem bei den vorhergehenden Untersuchungen angewendeten Verfahren behandelt.

1. 230 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 204 mg
2. 230 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 101 „
3. 230 ccm + 5 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 110 „
4. 230 ccm + 10 ccm einer 0,01 %igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 102 „

[1]) Centralbl. f. Physiol. 18.
[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9.
[3]) Arch. f. d. ges. Physiol. 121.
[4]) Diese Zeitschr. 30.

5. 230 ccm + 5 ccm einer 0,1 % igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten ü. 99 mg
6. 230 ccm + 10 ccm einer 0,1 % igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 105 „
7. 230 ccm + 5 ccm einer 1 % igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 98 „
8. 230 ccm + 10 ccm einer 1 % igen Bleiacetatlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 111 „

Versuch 14.

Hundeleber (300 g), behandelt wie in Versuch 13.

Der durch Aceton erhaltene Niederschlag wurde mit 2000 ccm physiol. Kochsalzlösung extrahiert. Zum Filtrat wurden 2 g Harnsäure zugesetzt; das Gemisch wurde in 8 Teile verteilt.

1. 230 ccm, sofort koaguliert, enthalten . . . . ü. 189 mg
2. 230 ccm, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten . . . . „ 92 „
3. 230 ccm + 5 ccm einer 0,01 % igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 93 „
4. 230 ccm + 10 ccm einer 0,01 % igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 91 „
5. 230 ccm + 5 ccm einer 0,1 % igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 93 „
6. 230 ccm + 10 ccm einer 0,1 % igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 94 „
7. 230 ccm + 5 ccm einer 1 % igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 91 „
8. 230 ccm + 10 ccm einer 1 % igen Bleinitratlösung, nach 3 Tagen unter ständiger Durchleitung eines kräftigen Luftstromes durch den Brutschrank, koaguliert, enthalten „ 97 „

Aus den mitgeteilten Versuchsprotokollen ergibt sich nun, daß **durch Zusatz von Bleiacetat bzw. Bleinitrat zu wässerigen Extrakten von Kalbsleber (Versuch 7 und 8), Kalbsniere (Versuch 9 und 10), Hundeleber (Versuch 11 und 12), ausgewaschener Hundeleber (Versuch 12 und 13)**

und zu dem nach Galeottis Verfahren aus Hundeleber isolierten urikolytischen Ferment das diesen Organen zukommende Vermögen, die zugesetzte Harnsäure zu zerstören, nicht wesentlich beeinflußt erscheint. Die bei den bleihaltigen Proben angetroffene, von den Kontrollproben abweichende Menge Harnsäure liegt innerhalb der Grenzen eines Rechnungsfehlers.

Wir können somit daraus schließen, daß Bleiacetat und Bleinitrat den Metabolismus der Harnsäure zu ändern vermögen; dieser ändernde Einfluß wird auf das Harnsäurebildungsferment oder Xanthinodase ausgeübt, dessen Tätigkeit bei Vorhandensein kleiner Mengen der genannten Salze eine stärkere, bei großen Mengen derselben hingegen eine schwächere ist.

Die Einwirkung der Bleisalze auf die zur Bildung von Harnsäure bildenden Fermente zeigt eine Ähnlichkeit mit der von denselben auf die totale Autolyse ausgeübten, denn es wird, wie ich bereits nachgewiesen[1]), die Leberautolyse durch kleine Mengen von neutralem Bleiacetat oder von Bleinitrat begünstigt, von großen hingegen gehemmt.

---

[1]) Compt. rend. Soc. Biol. 65.

Druckfehlerberichtigung

zu den Beiträgen (diese Zeitschr. Bd. 44):

Rudó und Cserna S. 40 bis 65.

43. Seite, 3. Zeile von unten, statt 1 bis 5 lies: **12 bis 14.**
43. Seite, letzte Zeile, statt 6, 7 und 9 bis 11 lies: **15, 16 und 18 bis 20.**
47. Seite, 10. Zeile von oben, statt Methode lies: **Protokolle.**
57. Seite, 7. Zeile von oben, statt prozentualen lies: **parenteralen.**

Alexander und Révész S. 95 bis 126.

109. Seite, in der Tabelle Mittelwerte (nach Tabelle X), 3. Stab, 2. Zeile ist der Mittelwert 59,20 aus den Versuchen 3 und 9 berechnet (Versuch 6 unberücksichtigt).
113. Seite, Tabelle (Mittelwerte: II), 1. Zeile, statt 30,17, 34,82, 4,65 und 15,4 lies: **30,66, 35,15, 4,49 und 14,6.**
113. Seite, Tabelle (Mittelwerte: II) 2. Zeile, statt 24,59, 26,23, 1,64 und 6,6 lies: **24,84, 25,59, 0,75 und 3,0.**
Desgleichen in Generaltabelle III, sowie an den betreffenden Stellen im Text.

Quagliariello S. 157 bis 161.

159. Seite, Tabelle II, statt $CHNO_3$, CHCl, CCH_3COOH lies: **HNO_3, HCl, CH_3COOH.**

Rohonyi S. 165 bis 179.

168. Seite, Anmerkung. In beiden Formeln bedeutet *t* nicht die Versuchstemperatur, sondern die Anzahl der Grade, um die die Versuchstemperatur 18° überschreitet.

Berczeller S. 193 bis 200.

189. Seite, 3. Zeile nach der Tabelle, statt 0,2 mg-Aquiv. lies: **$0{,}2\,^1/_{10}$ mg-Äquiv.**
197. Seite, 1. Zeile von oben. Der Satz: Diese Lösung wird nach Shimidzu verseift, ist zu streichen.

Belák S. 213 bis 234.

218. Seite, 9. Zeile von oben, statt X, XI, XII lies: **IV, XVI, XVII.**
218. Seite, 14. Zeile von oben, statt XI lies: **XVI.**
218. Seite, 15. Zeile von oben, statt VIII lies: **I.**
223. Seite, Tabelle D, 1. Stab, 2. Zeile, statt V lies: **X.**

Tangl S. 252 bis 278.

253. Seite, 11. Zeile von oben, nach 72 Stunden einzuschalten: **nach der letzten Fütterung.**

Autorenverzeichnis.

